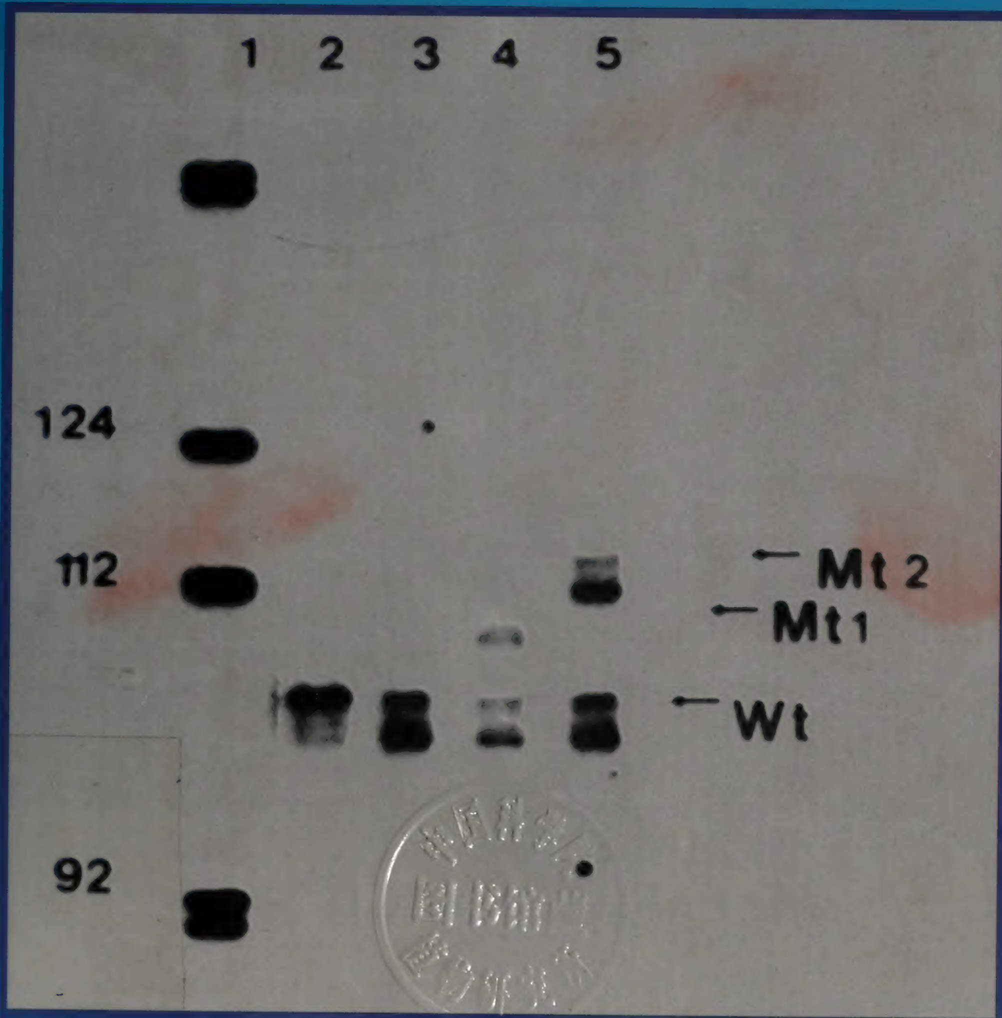
分子克隆
实验指南系列

DNA及RNA基本实验技术

Basic DNA and RNA Protocols

〔英〕A. J. 哈伍德 主编

盛小禹 等 译 盛祖嘉 等 校



科学出版社
www.sciencep.com

B0003526

58.17625…
406

分子克隆
实验指南系列

DNA 及 RNA 基本实验技术

[英]A.J.哈伍德 主编
盛小禹 等 译 盛祖嘉 等 校

科学出版社
北京

27850

中科院植物所图书馆
S0003528
58.1742505
406

分子克隆
实验指南系列

DNA及RNA基本实验技术

〔英〕A.J.哈伍德 主编

盛小禹等 译 盛祖嘉等 校

科学出版社
北京

27850

图字:01-1999-3196

内 容 简 介

本书包括基因工程中一些最基本的实验方法,例如DNA分析、RNA分析、克隆与亚克隆方法、PCR等,同时也介绍了诸如银染、非放射性标记、自动化DNA序列分析等新技术。本书对于专业科研人员来说可提供较新的技术参考材料,对于生物学、医学、药学等专业的本科生、研究生来说也是一本非常好的实验技术参考书,使读者在学习基因工程常规操作的同时能全面了解当前新技术的进展情况。

The original English-language work has
been published by HUMANA PRESS
Totowa, New Jersey, U.S.A.
All rights reserved.

图书在版编目(CIP)数据

DNA及RNA基本实验技术/(英)哈伍德(Harwood, A. J.)主编;盛小禹等译.—北京:科学出版社,2002.6
(现代生物技术译丛)
书名原文:Basic DNA and RNA Protocols

ISBN 7-03-009186-8

Ⅰ.D… Ⅱ.①哈… ②盛… Ⅲ.①脱氧核糖核酸-生物化学-技术②核糖核酸-生物化学-技术 Ⅳ.Q520.3

中国版本图书馆CIP数据核字(2001)第05033号

责任编辑:韩学哲
责任印制:刘士平/封面设计:王 浩

科学出版社 出版
北京东黄城根北街16号
邮政编码:100717
http://www.sciencep.com
源海印刷有限责任公司印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*

2002年6月第 一 版 开本:787×1092 1/16
2004年1月第二次印刷 印张:24
印数:4 001—6 000 字数:545 000

定价:47.00元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈环伟〉)

译 者 序

笔者自1985年加入基因工程实验教学的行列以来已有多年，在长期的实验教学过程中深感要找到一本合适的参考书之不易。对于基因工程的基础实验教学而言，能找到一本既介绍如核酸抽提、酶切、电泳、连接、转化、杂交、PCR、定点突变与DNA测序等基本技术，同时还介绍如非放射性标记、银染和自动化测序等最新进展的综合性书籍尤其困难。1997年偶然看到Humana公司出版的*Basic DNA and RNA Protocols*一书，阅读之后认为此书无论在内容、深度等方面都适合于作为实验教学的参考书，并且书的篇幅也并不庞大。尤其值得推荐的是每章末尾的注释部分，其中描述了实验中常出现的问题和解决这些问题的途径。由于本书的每一章都是由对本章内容富有实验经验或对于有关实验技术的早期发展曾做出贡献的作者所写，所以这些内容都是有价值的经验之谈。

本书中译本的出版像一个难产的婴儿。英文原作1996年出版，1997年购得，直到1998年才确定了出版社并组织人员开始翻译。以后的审校工作也遇到了不少困难，更值得一提的是本书审校者之一盛祖嘉先生在身患癌症住院之日起已在为本书工作，令人深感惋惜的是另一审校者王顺德先生未能看到本书，离我们而去。所幸今天终于到了交稿的日子，真可以说是如释重负了。

最后还要感谢科学出版社使本书得以问世，其中特别要感谢责任编辑的细致工作。此外还要感谢所有译者和审校者，感谢为本书文字的录入做了大量工作的同志，正是众人的努力才使读者终于能看到这本书。

盛小禹

2001.4.13

前　言

分子遗传学有时被称为“遗传工程”，它对生物学研究有巨大影响。现在离《分子生物学方法TM》第二卷《核酸》的出版已经12年，该书中包括当时通用的分子生物学和分子遗传学技术。这些技术发展很快，任何一本涉及其中基本技术的书都需要经常更新。最近一次修订是在1988年(《核酸新技术》第四卷)。在这以后许多新的、却是很基本的技术被写进《分子生物学方法》系列的某些分册中。《DNA及RNA基本实验技术》这部书旨在把所有这些基本技术包含在一本书中。

在过去的8年里，已有的技术经历了许多重大的创新和次要的改进。例如聚合酶链式反应(PCR)为基因克隆和重组DNA带来全新的方法。另一方面，一些较为次要的改进，例如测序酶TM使DNA测序变得更为平常。本书既包含这些正在修改中的新的技术，也包括老技术的及时更新。由于我们仍然处在一个快速更新的时代，本书中也包括一些虽已足够成熟，但仍有待于进一步改进的技术，特别是像非同位素检测以及日渐变得重要的非同位素DNA标记、银染和自动化测序等。

在新技术的开发方面，公司从来没有像现在这样起着重要的作用。有一些技术创新的公司为本书做出贡献，就此我们对他们表示感谢。商品化的试剂为我们的研究工作带来方便。可是也存在着一种危险，即令初学者忽略了这些技术中的原理。为了补偿这一倾向，我们把某些常由厂商提供的试剂的制备方法写入书中。

本书按照以往的《分子生物学方法》所采用的原则编写。每一章由一位或几位对于所写的一章富于实验室经验或者做出开创性贡献的学者撰写。每一章都以菜谱的格式表达，以便于在实验室中直接应用，非但包括基本方法的详细描述，而且在注释一节中讨论了可能遭遇的问题(以及解决问题的方法)和一些可提供尝试的变化。

本书分为7个部分：DNA分析、RNA分析、基因克隆技术、亚克隆方法、PCR技术、DNA序列测定、定点诱变与蛋白质合成。这是为了使用方便而这样设置的，不应该把它们看成是固定的单元。所有这些方法都是相互关联并相互促进的。在各章之间文献的交叉就足以显示它们的相互关系。

本书基本上是为初步接触这些技术的成熟的科学工作者所写。可是我也希望即使最有经验的科学家在书中也可以发现一些他(她)们所感兴趣的建议或提示。

我感谢《分子生物学方法》各分册的编辑先生，我借用了其中许多有用的章节。为了能对某一专门问题了解更多的方法，我向读者推荐叙述更为详尽的原书。我也对所有对本书做出贡献和提出修改意见者特别表示感谢。最后还向为本书的出版提供多方面帮助的Janet女士表示感谢。

Adrian J. Harwood

作　者

ALAN T. BANKIER • *MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK*
ALAN N. BATESON • *Department of Pharmacology, University of Alberta, Edmonton, Canada*
DOMINIQUE BELIN • *Department of Pathology, University of Geneva Medical School, Geneva, Switzerland*
LAURA J. BLOEM • *Department of Medical and Molecular Genetics, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN*
ANGELIKA BODENTEICH • *Laboratory of Biochemical Genetics, NIMH Neuroscience Center at St. Elizabeth's Hospital, Washington, DC*
CHARLES D. BOYD • *University of Medicine and Dentistry of New Jersey, New Brunswick, NJ*
MICHAEL M. BURRELL • *Advanced Technologies, Cambridge, UK*
DENISE CLARK • *Department of Biology, University of New Brunswick, Fredericton, Canada*
JOANNE CROWE • *QIAGEN GmbH, Hilden, Germany*
MARTIN CUNNINGHAM • *Research and Development, Amersham International, Amersham, Bucks, UK*
JEREMY W. DALE • *School of Biological Sciences, University of Surrey, UK*
BEVERLY C. DELIDOW • *Department of Anatomy, University of Connecticut Health Center, Farmington, UK*
WIN-PING DENG • *Department of Cancer Biology, Harvard University School of Public Health, Boston, MA*
LUCY DRURY • *JCRF Clare Hall Laboratories, South Mimms, UK*
ZIJIN DU • *Genome Sequencing Center, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO*
IAN DURRANT • *Research and Development, Amersham International, Amersham, Bucks, UK*

GREG S. ELGAR • *Molecular Genetics Unit, MRC Centre, Cambridge, UK*
CARL W. FULLER • *Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, UK*
PETER J. GREENAWAY • *Department of Health, London, UK*
ANNETTE M. GRIFFIN • *Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, UK*
HUGH G. GRIFFIN • *Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, UK*
ANNE GROBLER-RABIE • *MRC Unit for Molecular and Cellular Cardiology, University of Stellenbosch Medical School, Tygerberg, South Africa*
MARTIN HARRIS • *Research and Development, Amersham International, Amersham, Bucks, UK*
DANIEL L. HARTL • *Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University, Cambridge, UK*
BRONWEN HARVEY • *Research and Development, Amersham International, Amersham, Bucks, UK*
ADRIAN J. HARWOOD • *MRC Laboratory for Molecular Cell Biology and Department of Biology, University College, London, UK*
JANET C. HARWOOD • *Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, South Mimms, UK*
TIM HELENTJARIS • *Pioneer Hi-Bred Institute, Inc., Johnston, IA*
STEVEN HENIKOFF • *Howard Hughes Medical Institute, Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, WA*
ETIENNE JOLY • *Department of Immunology, AFRC Babraham Institute, Cambridge, UK*
ROSEMARY E. KELSELL • *Institute of Ophthalmology, Department of Molecular Genetics, London, UK*
JANE KIRK • *Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, Potters Bar, UK*
ROBB KRUMLAUF • *National Institute for Medical Research, Laboratory of Eukaryotic Molecular Genetics, London, UK*
MARK W. LEONARD • *Genetics Institute, Andover, MA*
PAUL LITTLEBURY • *Department of Biology, University of York, UK*
JOHN P. LYNCH • *Department of Anatomy, University of Connecticut Health Center, Farmington, CT*

LAURA MACHESKY • *MRC Laboratory for Molecular Cell Biology, Cambridge, UK*
ROBERTO MANTOVANI • *Faculté de Médecine, DOI/LGME, Strasbourg Cedex, France*
BRIGITTE STEUDE MASONE • *Qiagen, Inc., Chatsworth, CA*
STEVE MAYALL • *Imperial Cancer Research Fund, Clare Hall Laboratories, Potters Bar, UK*
BERNARD F. MCARDLE • *United States Biochemical Corp., Cleveland, OH*
TOM MCCREERY • *Department of Plant Sciences, University of Arizona, Tucson, AZ*
TIM MCDANIEL • *University of Maryland Hospital, Baltimore, MD*
STEPHEN J. MELTZER • *University of Maryland Hospital, Baltimore, MD*
FRANK MERANTE • *Department of Genetics, Research Institute, The Hospital for Sick Children, Toronto, Ontario, Canada*
CARL R. MERRIL • *Laboratory of Biochemical Genetics, NIMH Neuroscience Center at St. Elizabeth's Hospital, Washington, DC*
ELIZABETH M. MILLER • *Department of Cancer Biology, Harvard University School of Public Health, Boston, MA*
LLOYD G. MITCHELL • *Laboratory of Biochemical Genetics, NIMH Neuroscience Center at St. Elizabeth's Hospital, Washington, DC*
DAVID MURPHY • *Neuropeptide Laboratory, Institute of Molecular and Cell Biology, National University of Singapore, Republic of Singapore*
JAC A. NICKOLOFF • *Department of Cancer Biology, Harvard University School of Public Health, Boston, MA*
HOWARD OCHMAN • *Department of Genetics, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO*
LOUISE OLLIVER • *MRC Unit for Molecular and Cellular Cardiology, University of Stellenbosch Medical School, Tygerberg, South Africa*
ROGER PATIENT • *Developmental Biology Research Centre, Kings College, University of London, UK*
JOHN J. PELUSO • *Department of Anatomy, University of Connecticut Health Center, Farmington, CT*

GERALDINE A. PHEAR • *Department of Radiation Oncology, Health Sciences Center, University of Utah, Salt Lake City, UT*
ERAN PICHERSKY • *Department of Biology, University of Michigan, Ann Arbor, MI*
JEFFREY W. POLLARD • *Albert Einstein College of Medicine, Yeshiva University, Bronx, NY*
GREGORY M. PRESTON • *Department of Medicine and Biological Chemistry, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD*
GERALD PROTEAU • *College Universitaire de Saint-Boniface, Canada*
SANDEEP RAHA • *Department of Genetics Research Institute, The Hospital for Sick Children, Toronto, Canada*
F. ANDREW RAY • *Life Sciences Division, Los Alamos National Laboratory, Los Alamos, NM*
JUTA K. REED • *Departments of Biochemistry and Chemistry, Erindale College, University of Toronto, Ontario, Canada*
JOACHIM RIBBE • *Qiagen GmbH, Hilden, Germany*
BARTON E. SLATKO • *New England Biolabs, Inc., Beverly, MA*
DUNCAN R. SMITH • *Department of Colorectal Surgery, Singapore General Hospital, Republic of Singapore*
DANIELLE GIOIOSO TAGHIAN • *Department of Cancer Biology, Harvard University School of Public Health, Boston, MA*
FIONA M. TOMLEY • *Institute of Animal Health, Compton, UK*
MICHAEL K. TROWER • *Molecular Pathology Department, Glaxo Research and Development Inc., Greenford, UK*
STÉPHANE VIVILLE • *Faculty of Medicine, Institute of Genetics and Molecular and Cellular Biology, University of Louis Pasteur, CNRS/INSERM, France*
BRUCE A. WHITE • *Department of Anatomy, University of Connecticut Health Center, Framington, CT*
RICHARD K. WILSON • *Genome Sequencing Center, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO*
LEI YU • *Department of Medical and Molecular Genetics, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN*
QINGZHONG YU • *Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, AL*

译　者		审校者	
第一部分	盛小禹	盛祖嘉	沈仁权
第二部分	李　舰	沈仁权	盛祖嘉
第三部分	刘亚和	沈仁权	盛祖嘉
第四部分	盛小禹	沈仁权	盛祖嘉
第五部分	傅卫军	盛祖嘉	王顺德
第六部分	杨秀疆	王顺德	沈仁权
第七部分	王立新	盛祖嘉	王顺德

目　录

第一部分　DNA 分析 ……………………………………………………（ 1 ）

第一章　从组织或培养细胞同时分离 DNA 与 RNA ……………………（ 3 ）

第二章　DNA 的限制性内切酶消化……………………………………（ 9 ）

第三章　琼脂糖凝胶电泳 ……………………………………………（ 12 ）

第四章　琼脂糖凝胶电泳的印迹转移 ………………………………（ 16 ）

第五章　应用随机引物的 ^{32}P 标记 DNA 探针的制备 ……………………（ 19 ）

第六章　Southern 印迹的杂交和竞争性杂交 ……………………………（ 22 ）

第七章　Southern 杂交中地高辛修饰的核苷酸标记 DNA 探针的应用 ……（ 28 ）

第八章　荧光素标记核酸探针的制备及其碱性磷酸酯酶催化的二氧杂环烷化学发光反应检测 …………………………………………（ 36 ）

第九章　监测核酸探针中荧光素标记水平的快速检测 ………………（ 44 ）

第十章　辣根过氧化物酶标记的核酸探针制备及其强化的化学发光反应检测 ………………………………………………………（ 46 ）

第十一章　寡核苷酸 3′端的荧光素-11-dUTP 标记及其强化的化学发光反应检测 …………………………………………………（ 52 ）

第十二章　RNA 探针的制备………………………………………（ 57 ）

第十三章　非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 ……………………………（ 64 ）

第十四章　核酸的银染检测 …………………………………………（ 67 ）

第十五章　DNA 片段的末端标记……………………………………（ 72 ）

第二部分　RNA 分析 ……………………………………………………（ 77 ）

第十六章　Northern 印迹分析 ………………………………………（ 79 ）

第十七章　RNA 狭缝印迹分析………………………………………（ 91 ）

第十八章　RNase 保护测定法 ………………………………………（ 93 ）

第十九章　mRNA 的引物延伸分析 …………………………………（ 98 ）

第二十章　应用单链 DNA 探针的 S1 定位法 ………………………（ 105 ）

第二十一章　细胞及组织的非放射性原位杂交 ……………………（ 111 ）

第三部分　基因克隆技术 ……………………………………………（ 123 ）

第二十二章　DNA 的体外包装………………………………………（ 125 ）

第二十三章　应用 λ 置换型载体构建哺乳动物基因组文库 …………（ 129 ）

第二十四章　用于构建文库的双链 cDNA 制备 ……………………（ 140 ）

第二十五章　cDNA 文库的构建 ……………………………………（ 146 ）

第二十六章　λ 文库的筛选 …………………………………………（ 155 ）

第四部分　亚克隆方法……………………………………………………………（163）
第二十七章　亚克隆的策略与方法 ……………………………………………（165）
第二十八章　应用玻璃珠从琼脂糖凝胶中纯化 DNA 片段 ……………………（176）
第二十九章　大肠杆菌的转化 …………………………………………………（179）
第三十章　　细菌的电击穿孔转化 ……………………………………………（184）
第三十一章　应用碱裂解法制备质粒 DNA ……………………………………（190）
第三十二章　应用快速煮沸法制备小量质粒 DNA ……………………………（196）
第三十三章　应用硅藻土制备质粒 DNA ………………………………………（198）
第五部分　PCR 技术 ……………………………………………………………（201）
第三十四章　聚合酶链式反应：基本方法………………………………………（203）
第三十五章　反向聚合酶链式反应 ……………………………………………（216）
第三十六章　应用以简并寡核苷酸为引物的 PCR 技术克隆基因家族成员
……………………………………………………………………………（223）
第三十七章　应用 T-载体克隆 PCR 产物 ……………………………………（230）
第三十八章　PCR 产物的直接放射性标记 ……………………………………（239）
第三十九章　应用 PCR 技术快速筛选含克隆片段的菌落……………………（242）
第四十章　应用 PCR 技术筛选噬菌体文库……………………………………（245）
第六部分　DNA 序列测定 ………………………………………………………（249）
第四十一章　应用 M13 噬菌体作为载体克隆 DNA 片段 ……………………（251）
第四十二章　应用外切核酸酶Ⅲ制备有序缺失系列 …………………………（256）
第四十三章　M13 噬菌体生长和单链 DNA 制备 ……………………………（263）
第四十四章　从噬粒载体制备 ssDNA …………………………………………（266）
第四十五章　用于双脱氧测序的快速质粒纯化法 ……………………………（269）
第四十六章　应用测序酶 Version 2.0 T7 DNA 聚合酶进行 DNA 测序 ……（273）
第四十七章　线性和梯度缓冲液测序胶的灌注 ………………………………（284）
第四十八章　测序反应样品的电泳 ……………………………………………（287）
第四十九章　PCR 产物的直接测序 ……………………………………………（293）
第五十章　应用热循环-双脱氧法进行 DNA 测序 ……………………………（300）
第五十一章　自动 DNA 测序仪的使用 …………………………………………（308）
第五十二章　用于 Maxam-Gilbert DNA 测序法中的 DNA 末端标记 ………（319）
第五十三章　DNA 的化学测序……………………………………………………（323）
第七部分　定点诱变与蛋白质合成 ……………………………………………（327）
第五十四章　双链质粒的定点诱变、结构域置换以及标记获救………………（329）
第五十五章　应用含尿嘧啶的噬粒为模板的定点诱变法 ……………………（339）
第五十六章　无细胞系统中的 mRNA 翻译——兔网织红细胞裂解液………（344）
第五十七章　无细胞系统中的 mRNA 翻译——麦胚提取物…………………（350）
第五十八章　应用 6×His 标签和 Ni-NTA 树脂对重组蛋白进行一步纯化
……………………………………………………………………………（354）

第一部分
DNA 分析

第一章　从组织或培养细胞同时分离 DNA 与 RNA

Frank Merante, Sandeep Raha, Juta K. Reed,
Gerald Proteau

1. 引　　言

分离纯化 DNA[1~7]或 RNA[8~23]的方法已有很多，但往往只能纯化一种核酸而浪费了另一种。当细胞材料有限时，人们经常希望从一种材料中同时分离出 DNA 和 RNA，例如从活检样品中、从原始细胞系中以及从经过处理的胚胎干细胞中分离核酸。

已发表的几种方法尽管可以同时从一种材料中抽提 DNA 与 RNA[24~31]，但仍不过是 Chirgwin 等[8]原始方法的修改而已。这些方法利用硫代氰酸胍与三氟醋酸铯[25,27]等强促溶性试剂破坏细胞膜并同时使细胞内 RNA 酶失活[26,29,30]。这些方法的不利之处是须要用到超离心技术[26~28,30]并且实验过程太长（16～44 h）。

不用超离心技术而用酚同时分离 DNA 与 RNA 的方法是利用酚是高效的蛋白质变性剂[1,32]，它可以很快地破坏细胞的完整性并且使蛋白质变性[24~31]。这里所介绍的是在酚抽提过程中利用合适的抽提缓冲液以及选择性地从 RNA 中分离出高相对分子质量的 DNA 的方法[31]。

这个方法用了一次酚抽提与两次酚/氯仿抽提，从核酸溶液中同时去除蛋白质与脂质类杂质。就像 Wallace[33]讨论过的那样，水相抽提缓冲液的组成已调整到最适于回收核酸的状态，例如低 pH 值（pH 7.5），含有表面活性剂(0.2% SDS)和相对低盐的条件(100 mmol/L LiCl）都有利于蛋白质的分离并使核酸分配于水相中。此外100 mmol/L的 EDTA 能防止蛋白质集聚并且能螯合 Mg^{2+}，这样就抑制了依赖于 Mg^{2+} 的核酸酶的作用[34]。

这一方法与 Krieg 等人的方法[24]不同，前者裂解与抽提的步骤十分温和，能在乙醇沉淀后用带钩玻璃棒将高相对分子质量的 DNA 选择性地缠绕出来[2,34,35]，这样就避免了将所有核酸沉淀出来之后再用 LiCl 沉淀的步骤。此外此法可放大或缩小到针对不同量的样品处理，并且可以同时处理多个样品。分离全部的细胞 DNA 与 RNA 约需 2 h。用这一方法曾顺利地分离了 PC12 细胞的核酸并用于 Southern 与 Northern 印迹分析中[31]。

2. 材　　料

如果可能的话最好使用分子生物学级的试剂和一次性的灭菌聚丙烯管。如使用玻璃器皿则须预先在 280℃ 烘烤至少 3 h 方可。

2.1 非黏附型的组织培养细胞中核酸的抽提

1）PBS：0.137 mol/L NaCl，2.68 mmol/L KCl，7.98 mmol/L Na_2HPO_4，1.47 mmol/L KH_2PO_4，pH 7.2。

2）二乙基焦碳酸盐（diethylpyrocarbonate，DEPC）处理的水：1 ml DEPC 加入到 1 L 的重蒸水中（0.1%DEPC v/v）后搅拌过夜。20 psi（1psi = 6.89×10^3 Pa）高压灭菌 20 min 可使 DEPC 失活（参见注释 1）。

3）STEL 缓冲液：0.2% SDS，10 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5，10 mmol/L EDTA，100 mmol/L LiCl。在 DEPC 处理过的水中加入 Tris-HCl，EDTA 和 LiCl，高压灭菌后再加入适量的 10%SDS。10 g SDS 溶于 DEPC 处理过的水中配制成 10%SDS 贮存液，使用前 65℃ 保温 2 h。

4）酚：酚的平衡如前所述[34]。先用 pH 8.0 的 0.5 mol/L Tris-HCl 抽提含有 0.1%8-羟基喹啉（抗氧剂）的超纯重蒸酚一次，然后用 pH 8.0 的 0.1 mol/L Tris-HCl 反复抽提直到液相的 pH 值至 8.0 为止。使用前再用 STEL 抽提缓冲液平衡二次。经平衡处理的酚至少可于 4℃ 贮藏两个月。

5）酚/氯仿混合物：将等体积的氯仿加入到 STEL 平衡过的酚中混匀，混合物至少能在 4℃ 保存两个月。处理酚时必须戴上手套并在通风橱中进行。

6）5 mol/L LiCl：用 DEPC 处理过的水配制并进行高压灭菌。

7）TE：10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，1 mmol/L EDTA，pH 8.0，用 DEPC 处理过的水配制并进行高压灭菌。

8）RNA 保护剂：例如 RNA 酶抑制剂 RNasin（Promega；Madison，WI）。

2.2 上述方法的变化，用于黏附型的细胞培养物和组织

9）胰蛋白酶：以 0.125%的浓度溶于 PBS，短时间可保存于 4℃ 冰箱，长时间则应保存于冰冻柜中。

3. 方　　法

3.1 非黏附型的组织培养细胞中核酸的抽提

下面是从非黏附型的组织培养细胞中抽提核酸的具体步骤。3.2 节则是用此法抽提黏附型细胞培养与组织中核酸的方法。

为了防止皮肤上的 RNA 酶的污染，应在抽提过程中戴上一次性手套。此外，分离与分析 RNA 的器皿最好专用，例如玻璃器皿、移液管与电泳槽等。

1）细胞培养液（1×10^7）应置于冰水浴中（参见注释 2）。倒入 15 ml 聚丙烯管中，以 100 *g* 离心 5 min，用 10 ml 冰冷却的 PBS 缓冲液洗涤沉淀后再次离心。处理其他样品时可将沉淀细胞置于冰水浴中。

2）同时向管中加入 5 ml STEL 平衡过的酚与 5 ml 冰冷却的 STEL 缓冲液，轻轻倒转 3～5 min使沉淀细胞彻底悬浮（参见注释 3 和 4）。

3）20℃ 中以 100 000 *g* 离心 5 min 使两相分离，用灭菌的聚丙烯移液管将水相（上层）移至一个新的管中，再用等体积的酚/氯仿抽提两次（参见注释 5）。

4）将水相移至一个 50 ml 的 Falcon 管中，加入 0.1 倍体积的 5 mol/L 冰冷却的 LiCl 与 2 倍体积冰冷却的无水乙醇使高相对分子质量的 DNA 从 RNA 中分步沉淀出来，这时的 DNA 会立刻以线团状沉淀出来。

5）轻轻用带钩玻璃棒缠绕 DNA 使其呈结构紧密状态。将玻璃棒靠在管子的壁上以除去残留的乙醇，用 1 ml 70％冰冷却的乙醇淋洗缠绕在玻璃棒上的 DNA 以除去其中的盐分。小心地用冰冷却的 TE(pH 8.0)淋洗 DNA 以除去残留的乙醇(参见注释6)。

6）玻璃棒上的 DNA 溶解于适当体积的 TE（pH 8.0）中并于 4℃ 保存。

7）将剩余溶液置于 －70℃ 冰箱或乙醇/干冰浴中 30 min 使 RNA 沉淀出来。

8）10 000*g* 离心 15 min 沉淀 RNA 并小心地抽气除去残余的上清液。用冰冷却的 70％的乙醇淋洗沉淀，再次离心 5 min 并除去上清液。RNA 沉淀真空干燥后用 DEPC 处理过的水溶解。

9）对于以水溶液保存的样品可按制造商所提供的资料加入 5～10 U 的 RNasin（RNA 酶抑制剂)。另外，RNA 也可以安全地保存在乙醇/ LiCl 溶液中（参见注释 7 和 8)。

3.2 上述方法的变化，用于黏附型的细胞培养物或组织的核酸抽提

3.2.1 黏附型细胞的核酸抽提

1）用抽气法去除相当于 1×10^7 细胞的培养液，用 10 ml 37℃ 的 PBS 将细胞洗涤一次。

2）加入 1 ml 胰蛋白酶溶液后于 37℃ 保温直至细胞脱落。这步操作约需 10 min。加入冰冷却的 PBS 溶液稀释胰蛋白酶。

3）按照 3.1 节步骤 2～9 继续操作。

3.2.2 组织的核酸抽提

1）用冰冷却的 PBS 缓冲液淋洗约 500 mg 的无血组织，冷却后用灭菌刀片切成约 3～5 cm^3的小块。

2）将块状组织逐渐加到装有液氮的研钵中研碎至细粉末状。

3）缓慢地将粉碎的组织加到已混匀的 5 ml 酚和 5 ml STEL 溶液中。操作时最好用经烘烤的玻璃棒逐渐将粉碎的组织搅入酚/STEL 的乳浊液中，直至组分彻底混匀。继续轻轻上下倒转离心管 5 min。

4）按照 3.1 节步骤 3～9 继续操作。

4. 注　　释

(1) DEPC 是可疑的致癌剂，取用时应戴手套并在通风橱中操作。由于 DEPC 可作为酰

化剂作用于蛋白质中的组氨酸与酪氨酸，所以像 Tris 溶液等敏感材料不能直接用它进行处理，但可以用 DEPC 处理过的水来配制敏感的试剂。

(2) 使收集到的细胞与组织处于低温状态下有利于保持核酸的完整性。

(3) 此法成功的关键取决于是否能在温和条件下破碎细胞的同时使 DNA 保持高相对分子质量的完整状态。用 STEL/酚处理时应缓慢地将管上下倒转，这样可以减少 DNA 分子所受到剪切力的作用。

(4) 首次酚抽提时（第 3.1 节步骤 3）分配于水相（上层）与酚相界面上的含蛋白质水溶液可用酚/氯仿再次抽提以提高 DNA 的回收效率。

(5) 氯仿中通常以 24∶1（v/v）的比例加入异戊醇，后者是一种消泡剂。我们发现当用温和的手法倒转或在转轮上转动管子时不存在产生泡沫问题，所以在常规的操作中就可以省略异戊醇了。

(6) DNA 可以空气干燥，但再溶解时就要花费较长的时间。

(7) 当用上述方法选择性地除去高相对分子质量 DNA 后，剩余 RNA 中的 DNA 已不能被 EB 染色检出[31]。如果抽提纯化的 RNA 是被用在 PCR 反应中，则必须用 RNase 处理过的样品作为对照，保证其中没有 DNA 的污染。实际上这一处理对任何 RNA 纯化步骤都适用，特别是对于那些在操作步骤开始时就将 DNA 剪切的实验更为必要。

(8) 所用细胞数为 $1.5\times10^7\sim20\times10^7$，$A_{260}/A_{280}$ 约 1.86 时 RNA 的典型产量为 60～170 μg[31]。这些数据完全与使用硫代氰酸胍与 CsCl 法抽提的结果相接近[8]。

参 考 文 献

1. Graham, D. E. (1978) The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms of large tissue masses. *Anal. Biochem.* **85,** 609–613.
2. Bowtell, D. D. (1987) Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Anal. Biochem.* **162,** 463–465.
3. Longmire, J. L., Albright, K. L., Meincke, L. J., and Hildebrand, C. E. (1987) A rapid and simple method for the isolation of high molecular weight cellular and chromosome-specific DNA in solution without the use of organic solvents. *Nucleic Acids Res.* **15,** 859.
4. Owen, R. J. and Borman, P. (1987) A rapid biochemical method for purifying high molecular weight bacterial chromosomal DNA for restriction enzyme analysis. *Nucleic Acids Res.* **15,** 3631.
5. Reymond, C. D. (1987) A rapid method for the preparation of multiple samples of eukaryotic DNA. *Nucleic Acids Res.* **15,** 8118.
6. Miller, S. A. and Polesky, H. F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* **16,** 1215.
7. Grimberg, J., Nawoschik, S., Belluscio, L., McKee, R., Turck, A., and Eisenberg, A. (1989) A simple and efficient non-organic procedure for the isolation of genomic DNA from blood. *Nucleic Acids Res.* **17,** 8390.
8. Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., and Rutter, W. J. (1979) Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* **18,** 5294–5299.

9. Auffray, C. and Rougeon, F. (1980) Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumour RNA. *Eur. J. Biochem.* **107,** 303–314.
10. Elion, E. A. and Warner, J. R. (1984) The major promoter element of rRNA transcription in yeast lies 2 Kb upstream. *Cell* **39,** 663–673.
11. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA extraction by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162,** 156–159.
12. Hatch, C. L. and Bonner, W. M. (1987) Direct analysis of RNA in whole cell and cytoplasmic extracts by gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* **162,** 283–290.
13. Emmett, M. and Petrack, B. (1988) Rapid isolation of total RNA from mammalian tissues. *Anal. Biochem.* **174,** 658–661.
14. Gough, N. M. (1988) Rapid and quantitative preparation of cytoplasmic RNA from small numbers of cells. *Anal. Biochem.* **173,** 93–95.
15. Meier, R. (1988) A universal and efficient protocol for the isolation of RNA from tissues and cultured cells. *Nucleic Acids Res.* **16,** 2340.
16. Wilkinson, M. (1988) RNA isolation: a mini-prep method. *Nucleic Acids Res.* **16,** 10,933.
17. Wilkinson, M. (1988) A rapid and convenient method for isolation of nuclear, cytoplasmic and total cellular RNA. *Nucleic Acids Res.* **16,** 10,934.
18. Ferre, F. and Garduno, F. (1989) Preparation of crude cell extract suitable for amplification of RNA by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **17,** 2141.
19. McEntee, C. M. and Hudson, A. P. (1989) Preparation of RNA from unspheroplasted yeast cells *(Saccharomyces cerevisiae). Anal. Biochem.* **176,** 303–306.
20. Nemeth, G. G., Heydemann, A., and Bolander, M. E. (1989) Isolation and analysis of ribonucleic acids from skeletal tissues. *Anal. Biochem.* **183,** 301–304.
21. Verwoerd, T. C., Dekker, B. M. M., and Hoekema, A. (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* **17,** 2362.
22. Schmitt, M. E., Brown, T. A., and Trumpower, B. L. (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae. Nucleic Acids Res.* **18,** 3091.
23. Tavangar, K., Hoffman, A. R., and Kraemer, F. B. (1990) A micromethod for the isolation of total RNA from adipose tissue. *Anal. Biochem.* **186,** 60–63.
24. Krieg, P., Amtmann, E., and Sauer, G. (1983) The simultaneous extraction of high-molecular-weight DNA and of RNA from solid tumours. *Anal. Biochem.* **134,** 288–294.
25. Mirkes, P. E. (1985) Simultaneous banding of rat embryo DNA, RNA and protein in cesium trifluroracetate gradients. *Anal. Biochem.* **148,** 376–383.
26. Meese, E. and Blin, N. (1987) Simultaneous isolation of high molecular weight RNA and DNA from limited amounts of tissues and cells. *Gene Anal. Tech.* **4,** 45–49.
27. Zarlenga, D. S. and Gamble, H. R. (1987) Simultaneous isolation of preparative amounts of RNA and DNA from Trichinella spiralisby cesium trifluoroacetate isopycnic centrifugation. *Anal. Biochem.* **162,** 569–574.
28. Chan, V. T.-W., Fleming, K. A., and McGee, J. O. D. (1988) Simultaneous extraction from clinical biopsies of high-molecular-weight DNA and RNA: comparative characterization by biotinylated and ^{32}P-labeled probes on Southern and Northern blots. *Anal. Biochem.* **168,** 16–24.
29. Karlinsey, J., Stamatoyannopoulos, G., and Enver, T. (1989) Simultaneous purification of DNA and RNA from small numbers of eukaryotic cells. *Anal. Biochem.* **180,** 303–306.

30. Coombs, L. M., Pigott, D., Proctor, A., Eydmann, M., Denner, J., and Knowles, M. A. (1990) Simultaneous isolation of DNA, RNA and antigenic protein exhibiting kinase activity from small tumour samples using guanidine isothiocyanate. *Anal. Biochem.* **188,** 338–343.
31. Raha, S., Merante, F., Proteau, G., and Reed, J. K. (1990) Simultaneous isolation of total cellular RNA and DNA from tissue culture cells using phenol and lithium chloride. *Gene Anal. Tech.* **7,** 173–177.
32. Kirby, K. S. (1957) A new method for the isolation of deoxyribonucleic acids: evidence on the nature of bonds between deoxyribonucleic acid and protein. *Biochem. J.* **66,** 495–504.
33. Wallace, D. M. (1987) Large and small scale phenol extractions, in *Methods in Enzymology, vol. 152: Guide to Molecular Cloning Techniques* (Berger, S. L. and Kimmel, A. R., eds.), Academic, Orlando, FL, pp. 33–41.
34. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, Harbor, NY.
35. Davis, L. G., Dibner, M. D., and Battey, J. F. (1986) *Basic Methods in Molecular Biology.* Elsevier, New York.

第二章　DNA 的限制性内切酶消化

Duncan R. Smith

1. 引　　言

在特定位点切割 DNA 的方式为今天的基因工程奠定了基础。限制性内切酶来自细菌，能对双链 DNA 的特定目标序列进行切割从而产生特定的片段，这些酶可以从大多数生物工程制品公司购得。酶的命名是按照 Smith 与 Nathans 的建议[1]。从酶的名称上(例如 *Bam*HⅠ、*Eco*RⅠ等）可以知道酶的来源，但不能知道任何有关于酶的切割特性(参见注释 1)，而切割特性恰恰是因酶而异的。大部分常用酶的切割位点具有短的回文对称序列，通常是 4、5 或 6 个碱基的长度，例如 AGCT（*Alu*Ⅰ)、GAATTC（*Eco*RⅠ)等。每一种酶在特定的回文对称位点上切割，但也有两种不同的酶识别同一种序列，却切割识别序列内的不同位置。酶的切点可以分为三类：一类是切割位点位于中间而产生平末端，另外两类则在 5′或 3′突出末端产生不配对的碱基。有关限制性内切酶的全面综述可参考 Fuchs 与 Blakesley[2]的资料。

2. 材　　料

1）适当的限制酶缓冲液：10×贮存液（参见注释 2)。
2）待切的 DNA 溶于水或 TE（10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.3，1 mmol/L EDTA）中(参见注释 3 和 4)。
3）浓度为 1 mg/ml 的牛血清白蛋白（BSA)（参见注释 5)。
4）灭菌蒸馏水（参见注释 6)。
5）正确选择的酶（参见注释 7)。
6）5×点样液：50%（v/v）甘油，100 mmol/L Na_2EDTA、pH 8.0，0.125%（w/v）溴酚蓝（6pb)，0.125%（w/v）二甲苯青。
7）100 mmol/L 亚精胺（参见注释 8)。

3. 方　　法

1）除酶以外的所有溶液解冻后置于冰水浴中。
2）确定酶切反应的最终体积，通常是 10～50 μl（参见注释 9)。在灭菌的 Eppendorf 管中加入 1/10 终体积的酶切缓冲液、1/10 终体积的 BSA，0.5～1 μg 的待切割 DNA(参见注释 3)，最后再加灭菌蒸馏水至反应终体积。
3）直接从 −20℃ 冰箱中取出酶。用干净的灭菌吸管吸取所需要的单位数（参见注释 7

和 10）后立即放入反应混合液中并混匀（参见注释 11）。

4）将管子放在合适的温度中（参见注释 12）保温约 1 h，基因组 DNA 可以酶切过夜。

5）取出部分酶切样品(通常1～2 μl)与5×点样液混合后进行电泳分析(参见第三章)。

4. 注　　释

（1）酶的命名是按照 Smith 与 Nathans[1]所建议的，即根据首次分离到该酶的细菌而得名。限制酶名称的第一个字母是属名，后两个是种名，从而构成酶名的三字母缩写形式。例如从 *Providencia stuartii* 中分离的酶定名为 *Pst*，从这一种细菌分离得到的第一种酶定名为 *Pst* Ⅰ，第二种酶为 *Pst* Ⅱ，余类推。但要注意的是酶的命名中并未给出任何关于酶切位点的信息，而这些必须从酶的切割特性表中方能查到。大多数提供酶的公司的产品目录中载有详细的酶切特性资料，这些特性包括酶的切割特性、酶的最适反应条件以及在常用 DNA 模板上的切割位点数等。这些产品目录都应该认为是有价值的信息来源。

（2）每一种酶都有最适反应缓冲液，这些推荐的反应条件通常都包括在制造商提供的测试表格中。实际上很多酶反应都可以使用一种共同的条件，这就可以配制一种适用于大多数酶反应的通用缓冲液。绝大多数酶能在三种缓冲液的任何一种中进行切割反应。它们分别是高盐、中盐与低盐缓冲液，配方列在下面。这些缓冲液通常是配成 10×的浓度，使用时在待消化样品中加入终体积的 1/10 即可。必须注意的是使用的缓冲液必须与酶匹配，用错缓冲液会导致酶活力剧降，酶切特异性改变甚至出现酶活力完全丧失的现象。有些制造商还会额外提供合适的缓冲液以示优惠，建议使用这些酶时应同时使用该厂商所提供的酶切缓冲液。

a. 高盐缓冲液（1×）：100 mmol/L NaCl，50 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，10 mmol/L $MgCl_2$，1 mmol/L DTT

b. 中盐缓冲液（1×）：50 mmol/L NaCl，10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，10 mmol/L $MgCl_2$，1 mmol/L DTT

c. 低盐缓冲液（1×）：10 mmol/L Tris-HCl，pH 7.5，10 mmol/L $MgCl_2$，1 mmol/L DTT

除此之外还有两种有时采用的“通用缓冲液”，在通用缓冲液中所有的限制酶都有活力，但在有些情况下酶活力会下降到最大活力的 20%。这种通用缓冲液是谷氨酸钾盐[3]和醋酸钾盐[4]缓冲液。这两种缓冲系统特别适用于须用两种完全不同的缓冲系统进行 DNA 切割的实验中。

（3）待切割 DNA 的量取决于以后的实验步骤。如果是为了鉴定质粒 DNA 中有否插入片段，那么合适的酶切 DNA 量约为 500 ng 至 1 μg，当然酶切的 DNA 量还与插入片段的大小有关。插入片段愈小酶切的 DNA 量应愈大，只有这样才能在以后的电泳中观察到插入的片段。

（4）所切割的 DNA 应该有较高的纯度，DNA 样品中不能存在如酚、氯仿、乙醇、盐、去污剂以及螯合剂等杂质，即使是痕量的这类化学物质也会抑制酶的反应或是使酶失活。

（5）为了稳定低蛋白浓度的酶制剂以及防止变性，酶的反应体系中通常须加入 BSA。

(6) 酶切时必须选用高质量的灭菌蒸馏水，水中不可含有无机离子、有机化合物以及去污剂。

(7) 1 个酶单位的定义为：在最适的温度与缓冲液的条件下，1 h 内完全切割 1 μg 的标准 DNA（λDNA）所需的酶量。λDNA 上有 5 个 *Eco*R I 切点，如果用 1 个单位的 *Eco*R I 来切割只含一个切点的质粒 pBR322，作用时间为 1 h，这样就相当于用了 5 倍过量的酶了。

(8) 切割基因组 DNA 时加入的亚精胺至终浓度为 1 mmol/L 能显著提高酶切效率，因为带正电荷的亚精胺会与带负电荷的杂质结合。须注意低温条件下亚精胺可使 DNA 沉淀，所以当反应物置于冰浴中时不可加入亚精胺。

(9) 实际使用中最小的酶切体积是 10 μl，少于这个体积时吸量可以造成显著的误差。10 μl 的酶切体积也使得加入终止/点样液后可以全部加到不大的电泳凝胶的点样孔中。如果 DNA 贮存液的浓度太稀，5～6 μl 内的含量达不到 0.5～1 μg，则可将反应体积按比例放大到 20～50 μl 。如果进行双酶切反应（即用两种不同的酶进行切割）则推荐使用的最小体积为 20 μl ，这时两种酶各加 1 μl 便可将甘油浓度控制在较低的范围内（参见注释 10）。

(10) 不少酶对甘油是敏感的。大多数的酶是贮存在 50%（v/v）甘油中供应的。反应体系中如果甘油的浓度超过 10% 时会造成非特异性位点的切割（称为星号活性，star activity）。为了避免这种情况的发生应将加酶量控制在与反应总体积的比例为 1∶10 或更低。同样，盐浓度的异常也会造成酶的星号反应。

(11) 酶对热是非常不稳定的，所以从 −20℃ 冰箱中取出的时间应越短越好，取出后也应立即置于冰浴中。

(12) 大多数的酶在37℃ 保温进行反应，但并不是所有的酶都如此。例如 *Taq* I 为65℃、*Sma* I 为25℃，所以使用前应先核对一下那些新的或是不熟悉的酶反应温度。

(13) 当进行制备型酶切时（100～500 μl 反应总体积）可按比例放大，但必须注意保证各反应组分混匀，特别是对于黏度较大的反应成分如 DNA 溶液与酶的贮存液等。无论对于什么体积的酶切反应来说都应避免使用涡旋振荡器进行混合，因为这种操作会显著影响酶的活性。对于小体积来说可以轻轻地用手指弹管壁进行混合，然后放在 Eppendcrf 离心机中离心 1～5 s 使所有的液体都集中到管子的底部。对于较大的酶反应体积则可借助于微量移液器，将底部的液体吸至上层处混合直至各组分混匀为止。

参 考 文 献

1. Smith, H. O. and Nathans, D. (1973) A suggested nomenclature for bacterial host modification and restriction systems and their enzymes. *J. Mol. Biol.* **81,** 419–423.
2. Fuchs, R. and Blakesley, R. (1983) Guide to the use of Type II restriction endonucleases. *Methods Enzymol.* **100**, 3–38.
3. McClelland, M., Hanish, J., Nelson, M., and Patel, Y. (1988) KGB: a single buffer for all restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res*. **16,** 364.
4. O'Farrell, P. H., Kutter, E., and Nakanishe, M. (1980) A restriction map of the bacteriophage T4 genome. *Mol. Gen. Genet*. **170,** 411–435.

第三章　琼脂糖凝胶电泳

Duncan R. Smith

1. 引　　言

无论是出于制备还是出于分析的目的，酶切后的 DNA 样品（参见第二章）往往须分离切割产物并观察酶切结果。绝大多数情况下这些片段的长度在 200～20 000 bp 之间，通常可用琼脂糖凝胶电泳测定片段的长度。琼脂糖是一种从海藻中提取的、分子为线状的多聚物，出售的产品呈白色粉末状，粉末溶化在缓冲液中冷却后由于氢键的形成而呈胶状。凝胶中的孔径与胶的浓度有关，胶的浓度可以用琼脂糖在电泳缓冲液中的百分数表示（w/v），常用浓度为 0.3%～3%。电泳的装置也有多种，例如有些可进行垂直胶电泳或是进行水平胶电泳，电流可经灯芯或电泳缓冲液导通。但是将胶浸入缓冲液中进行电泳几乎是目前最通用的方法。在这种方法中先将胶制于胶模上，然后浸入合适的电泳缓冲液中。点样孔则用“梳子”插入到尚未固化的胶中形成。点样时要在样品中混入比重较大的液体（点样液），使样品的比重增大，保证其沉到点样孔的底部。

电泳仪甚至可认为是实验室设备中最重要的仪器。电泳仪由四个主要部分组成：电源（至少有 100 V 与 100 mA 的直流输出）、电泳槽、胶模以及一个能形成点样孔的梳子。电泳装置可以从许多公司购买，但是价格都很贵。除购买外电泳仪也可以自制，只需要几块有机玻璃板与一些小型的电器。制造电泳仪器的方法已不属于本章讨论的范围，但可以从参考资料[1~3]中找到。

电泳的原理是当胶中的 DNA 分子处在一个稳定的电场中时，它们首先一端向前地排列好[4,5]，然后以反比于碱基对数目的 lg 的速度向前移动，这是因为大分子受到更大的摩擦阻力使它更难于通过胶孔，因此比小分子移动得更慢。这种迁移速率与相对分子质量之间的关系仅适用于线型分子。环状质粒分子的迁移速率远远快于它相对分子质量所应有的迁移速率，说明环状分子在胶中具有比实际相对分子质量小的表现相对分子质量。迁移速率还与其他因素有关，诸如电泳缓冲液的组成、离子强度以及琼脂糖凝胶的浓度等。胶浓度是控制分辨率的最佳手段（参见表 3.1）。关于凝胶电泳的理论可参阅 Sambrook 等人的著作[1]。

2. 材　　料

1）分子生物学级的琼脂糖（高熔点，参见表 3.1）。
2）1× 和 10× 的电泳缓冲液（选择时参见表 3.2）。
3）灭菌蒸馏水。
4）电热板或是微波炉。

表 3.1 琼脂糖凝胶的分离效果

琼脂糖浓度/%	相对分子质量范围/kb	说　明
0.2	5～40	胶非常易碎，分离 20～40 kb 的片段时增加电泳缓冲液离子的强度（就是用 Loenings E 缓冲液）可以改进分离效果，但只能用高熔点胶进行制胶。
0.4	5～30	倍加小心的情况下可使用低熔点胶。
0.6	3～10	基本同上但有较大的机械强度。
0.8	1～7	这是一般电泳常用的凝胶浓度，选用不同的缓冲液时不会有很大影响。溴酚蓝在胶中泳动的速率相当于 1 kb 的 DNA 片段。
1	0.5～5	性质与 0.8%的胶类似。
1.5	0.3～3	同上，溴酚蓝在胶中泳动速率相当于 500 bp 的 DNA 片段。
2	0.2～1.5	倒胶时胶的温度不应低于 50℃。
3	0.1～1	可以分离相对分子质量彼此相差不多的小分子 DNA，倒胶时必须很快地倒在预热过的玻璃板上。

表 3.2 常用琼脂糖凝胶的电泳缓冲液

缓　冲　液	说　明	溶　液
Loenings E	高离子强度，不适用于制备型电泳	5 L 10×溶液中含有：218 g Tris 碱，234 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$，18.6 g $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$
甘氨酸	低离子强度，非常适用于制备型电泳，也可用于分析型电泳。	2 L 10×溶液中含有：300 g 甘氨酸，300 ml 1 mol/L NaOH（或是 12 g 固体），80 ml 0.5 mol/L EDTA，pH 8.0
Tris-硼酸-EDTA（TBE）	低离子强度，可用于制备型或分析型电泳。	5 L 10×溶液中含有；545 g Tris，278 g 硼酸，46.5 g EDTA
Tris-醋酸（TAE）	特别适用于分析型和用玻璃珠法纯化 DNA 片段的制备型电泳（参见第二十八章）。	1 L 50×的溶液中含有：242 g Tris 碱，57.1 ml 冰醋酸与 100 ml 0.5 mol/L EDTA，pH 8.0

5）合适的电泳仪与电源（参见第一部分）。

6）溴化乙锭（EB）：10 mg/ml 的 EB 母液（参见注释 1）。EB 既是诱变剂又是致癌剂，所以用时必须非常小心。

7）紫外（UV）透射装置（长波紫外线、365 nm）。

8）5×点样液（参见注释 2）：点样液的配方有多种，下面介绍的是比较标准的一种：50%（v/v）甘油，50 mmol/L EDTA，pH 8.0，0.125%（w/v）溴酚蓝，0.125%（w/v）二甲苯青。

9）相对分子质量标准：某种 DNA 经限制酶切割后产生已知相对分子质量的片段作为相对分子质量标准。许多这类标准有商品供应。

3. 方　　法

1）在锥形瓶中小心地称取所需量的粉状琼脂糖（参见表 3.1）。

2）加入 1/10 终体积的 10×电泳缓冲液后加入蒸馏水至终体积。

3）摇动锥形瓶混匀琼脂糖粉，置于电热板上或微波炉中加热至刚沸使琼脂糖粉溶化。

4）冷却到 50℃时加入 EB 至终浓度为 5 μg/ml，将胶倒入胶模中。

5）将梳子插入胶中待凝胶固化后形成加样孔。

6）待胶凝固后小心地拔出梳子并将胶模放到电泳槽中。倒入 1× 电泳缓冲液刚好淹没点样孔。

7）在 DNA 样品中（参见注释 3）混入 5× 点样液并加到点样孔中，所有的样品要同时点上。通常还要在另一个点样孔中加上相对分子质量标准。

8）盖上盖子并接通电源（参见注释 4）。电泳的时间根据不同的胶浓与胶长而异，通常为 1～3 h。

9）电泳结束后取出胶模，酶切的结果可在紫外线灯下观察。

4．注　　释

(1) 很多人不喜欢将 EB 加在胶中或是缓冲液中进行电泳，而乐于在电泳后将胶染色，这是因为 EB 加入到胶中后会影响 DNA 的迁移，特别是当分子中有环状构型（超螺旋或是开环）的质粒时。不过当有或无 EB 的条件一致时那就不会有什么困难了。使用 EB 时遇到的第二个问题是 EB 会促进紫外线照射下 DNA 的损伤（光切口），所以对于胶中或是缓冲液中含有 EB 的电泳，最好减少观察时间以防止 DNA 的损伤及以后的再电泳过程中形成模糊的条带。

(2) 点样液是一种比重很大的溶液（通常含甘油或聚蔗糖），当与 DNA 溶液（或限制酶切割的反应液）混合时会使样品具有较大的比重而易于沉到已灌有电泳缓冲液的点样孔的底部。点样液中通常含有一至二种与 DNA 分子在电场中具有相同泳动方向的指示染料，这两种常用的染料是溴酚蓝与二甲苯青。这些染料具有彼此不同的迁移速率，以用来监测电泳的进程，保证 DNA 分子不至于走出胶的终端。在 0.8%（w/v）琼脂糖凝胶中溴酚蓝的迁移速率相当于 1 kb 的 DNA，二甲苯青则相当于 4 kb 的 DNA。

(3) 在理想的情况下 EB 染色时能观察到的单一 DNA 条带量可低至 10 ng，在一般的情况下 100 ng 的单一条带是很容易被看到的。对产生大量条带的酶切样品则要加入较多的 DNA 才能观察到所有的条带。

(4) 进行分析胶电泳时产生最佳分辨率的电场强度约为 10 V/cm，如果 DNA 片段为 5 kb或是更大则采用 5 V/cm 才能得到最佳分辨率。当 DNA 片段小于 1 kb 时采用较高的电场强度通常也能得到较好的分辨率。

参 考 文 献

1. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
2. Sealey, P. G. and Southern, E. M. (1982) Electrophoresis of DNA, in *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A Practical Approach* (Rickwood, D. and Hames, B. D., eds.), IRL, Oxford and Washington, pp. 39–76.

3. Boffey, S. A. (1984) Agarose gel electrophoresis of DNA, in *Methods in Molecular Biology Vol. 2: Nucleic Acids* (Walker, J. M., ed.), Humana, Clifton, NJ, pp. 43–50.
4. Fisher, M. P. and Dingman, C. W. (1971) Role of molecular conformation in determining the electrophoretic properties of polynucleotides in agarose-acrylamide composite gels. *Biochemistry* **10**, 895.
5. Aaij, C. and Borst, P. (1972) The gel electrophoresis of DNA. *Biochem. Biophys. Acta* **269**, 192.
6. Helling, R. B., Goodman, H. M., and Boyer, H. W. (1974) Analysis of R.EcoRI fragments of DNA from lambdoid bacteriophages and other viruses by agarose gel electrophoresis. *J. Virol.* **14**, 1235–1244.

第四章　琼脂糖凝胶电泳的印迹转移1)

Duncan R. Smith, David Murphy

1. 引　　言

Southern 杂交是大家都已熟知的技术[1]。DNA 经限制性内切酶（参见第二章）切割后通过琼脂糖凝胶电泳（参见第三章）分离成大小不同的片段。然后将 DNA 通过脱嘌呤达到部分降解（使较大片段的 DNA 便于转移），并将胶依次浸泡在 HCl 与 NaOH 溶液中进行碱变性。然后将变性的 DNA 片段转移到固体基质上或是滤膜上（通常用尼龙膜）对特定标记的探针进行杂交（参见第六章）。

2. 材　　料

1）尼龙杂交膜（例如 Amersham［UK］公司的 Hybond-N，参见注释 1）
2）毛细管转移系统（参见注释 2）。
3）脱嘌呤缓冲液：0.25 mol/L HCl。
4）变性缓冲液：1.5 mol/L NaCl，0.5 mol/L NaOH。
5）转移缓冲液：1.5 mol/L NaCl，0.25 mol/L NaOH。
6）20×SSC ：3 mol/L NaCl，0.3 mol/L 柠檬酸钠、pH 7.0。
7）312 nm 透射紫外线灯。

3. 方　　法

1）酶切 DNA 并进行电泳分离（参见第二、三章；注释 3、4）。
2）用干净的刀片切去无用的凝胶。
3）将凝胶浸泡在约 3 倍胶体积的脱嘌呤缓冲液中，于室温中缓慢摇动 30 min 或是待胶中的溴酚蓝变为黄色为止。
4）倾滗除去脱嘌呤缓冲液，加入3倍胶体积的变性缓冲液，室温下轻轻地摇动30 min。
5）倾滗除去变性缓冲液，加入 3 倍胶体积的转移缓冲液，室温下轻轻地摇动 30 min 以利于平衡。
6）将胶放在灌有转移缓冲液的毛细管转移装置2)的平台上，转移装置如图 4.1 所示。装置由装有转移缓冲液的贮液槽与位于其上的平台组成，“灯芯”由四层厚的

1）题目原文为 Capillary blotting，这里译作印迹转移。——译者注

2）即通过毛细管现象吸引液体的装置，也即常称的 Southern 印迹装置。——译者注

3 MM滤纸构成，纸的一端附着在平台上，另一端浸于转移缓冲液中，滤纸中所有气泡都应去除干净。平台的长度与宽度与胶相当，灯芯应切成同样的宽度。平台的高度与贮液槽的高度相等。

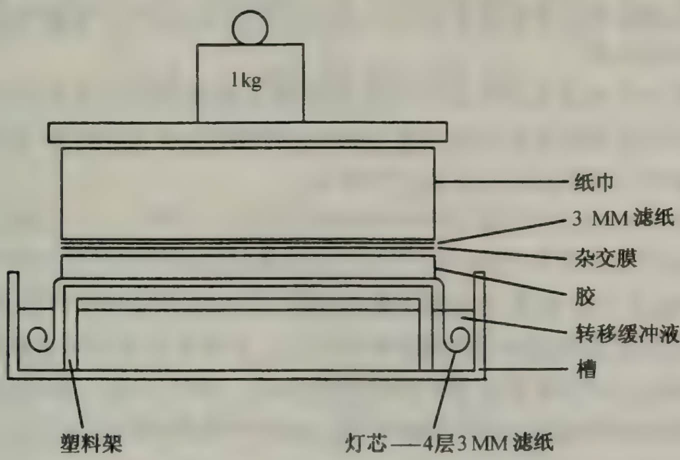


图 4.1　典型的毛细管作用 Southern 转移系统。

7）剪下一块与胶同样大小的尼龙膜漂浮于重蒸水水面上使之湿润，然后用转移缓冲液淋洗。将膜覆盖于胶上并赶出所有的气泡。

8）将四张 3 MM 滤纸剪成与胶同样的大小，其中两张浸于转移缓冲液后覆盖于膜上，赶出所有的气泡。另外两张干的置于两张湿的滤纸上部，然后在上层滤纸上放一叠干的纸巾。在纸巾的顶部压 1 kg 的重物，转移至少 12 h。

9）卸下转移装置。在将凝胶与膜分离之前先在点样孔的位置做上记号，如果是用铅笔做记号的话就会在以后的放射自显影底片上出现此记号。用 2×SSC 缓冲液淋洗膜后放在 80℃烘箱中烘烤 20～60 min。

10）用 312 nm 的紫外线透射灯照射可使 DNA 共价交联于膜上。将膜的含 DNA 的一面向下放在一片保鲜膜（如 Saran Wrap^{TM}）上于紫外线下照射 2～3 min（参见注释 5）。

11）做好的膜可以立即进行杂交（参见第六章）或烘干贮存备用。

4. 注　　释

（1）注意以上这些方法是在中性尼龙膜（例如 Amersham 公司的 Hybond-N）基础上发展起来的，但在带正电荷尼龙膜（例如 Amersham 公司的 Hybond-N^{+}、Bio-Rad ［Richmond, CA］公司的 Zetaprobe 以及 NEN-Du Pont ［Boston, MA］公司的 GeneScreen^{TM}-Plus 等）上未经试用过。

（2）以上介绍的毛细管转移法虽然很有效但却比较费时。有些公司发展了其他系统（例如 Pharmacia-LKB ［Uppsala, Sweden］公司与 Hybaid ［Twickenham, UK］公司的真空印迹系统以及 Stratagene ［La Jolla, CA］）公司的正压印迹系统都能将印迹时间缩短至 1 h。

(3) 与标准的 DNA 片段对照可以定出杂交条带所显示分子的大小（例如用*Eco*RⅠ与*Hin*dⅢ限制酶切割的 λ 噬菌体 DNA 或是 Life Technologies［Gaithersburg，MO］公司提供的 1 kb 阶梯状相对分子质量标准）。最好是使用经放射性同位素末端标记的相对分子质量标准（参见第十五章），这样在最后的放射自显影底片上就会在相对应的位置出现条带。

(4) 基因拷贝数可以通过 Southern 印迹法比较基因组杂交信号强度与拷贝数标准的强度（可通过定量稀释未标记的克隆 DNA 片段获得）而测定。前者的数据还须参照探针对标准宿主基因的杂交结果进行校正。

(5) 最适强度的紫外线照射能使 DNA 有效地交联在尼龙膜上，一旦超过这一强度再行照射反而会使交联效率下降。由于这一原因最好在使用前对紫外线源进行标定：将等量的 DNA 点在几张膜上，置于紫外线灯下照射不同的时间后与同一个探针杂交，杂交信号的强弱可以指示最适照射强度。注意紫外线的输出强度与灯管已用时间有关，所以有必要对紫外线灯进行常规标定。有些厂商（例如 Stratagene）生产的交联型紫外线灯可自动调节输出能量，使膜得到最佳的照射时间。

参 考 文 献

1. Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**, 503–517.

第五章　应用随机引物的^{32}P标记DNA探针的制备

Duncan R. Smith

1. 引　　言

用随机引物标记DNA的方法现在已经差不多完全取代了切口平移（nick translation）标记法。建立在Feinberg与Vogelstein[1]方法基础上的随机引物法是一种将放射性的核苷三磷酸掺入到整个DNA链中去的方法。随机引物法标记DNA时能得到$2\times10^9\sim5\times10^9$dpm/μg（参见注释1）的比活。下面介绍的方法基本上来自Feinberg与Vogelstein[2]。首先将DNA片段放在水浴中煮沸使之变性，接着将随机的寡核苷酸序列复性到两条链上，DNA聚合酶的Klenow片段使寡核苷酸延伸，所使用四种核苷三磷酸中的三种是无放射性的核苷酸，另外一种是有放射性的核苷酸，延伸反应的结果是形成均一放射性标记的双链DNA探针。每一批随机合成的引物都含有所有可能的序列（例如最常用的六核苷酸中就含有4096种不同寡核苷酸的组合），所以任何模板DNA都可以用这种方法进行标记。

2. 材料（参见注释2）

1）溶于水或1×TE（10 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA、pH 8.0，参见注释3）中的待标记DNA。

2）OLB缓冲液。配制下列溶液：

溶液O：1.25 mol/L Tris-HCl、pH 8.0，0.125 mol/L $MgCl_2$（贮存于4℃）。

溶液A：1 ml溶液O，18 μl β-巯基乙醇，5 μl dATP1)，5 μl dTTP1)，5 μl dGTP1)。

溶液B：2 mol/L HEPES，用4 mol/L NaOH将pH值调成6.6（贮存于4℃）。

溶液C：均匀悬浮于pH值为8.0的TE中的六核苷酸混合物(不会全溶)，OD_{260}U/ml为90（贮存于−20℃）。

配制OLB缓冲液：将溶液A、B、C以100∶250∶150的比例混合，贮存于−20 ℃。

3）α位置标记^{32}P的核苷三磷酸，例如^{32}P-dCTP：SA 3000 Ci/ mmol/L，贮存于−20℃。

4）Klenow片段：DNA聚合酶I的大片段（1 U/μl），贮存于−20℃。

5）10 mg/ml的牛血清白蛋白（BSA），溶于水中。

1）这里每一种核苷酸已经溶解于3 mmol/L Tris-HCl，0.2 mmol/L EDTA、pH 7.0，浓度0.1 mol/L。——译者注

3. 方法（参见注释 4）

1）取大约 30 ng 待标记 DNA（探针）溶于灭菌蒸馏水中至终体积为 31 μl。
2）煮沸大约 3 min 后立即置于冰浴中。
3）按顺序加入下列各试剂：10 μl OLB 缓冲液，2 μl 10 mg/ml 的 BSA，5 μl 标记的核苷三磷酸，2 μl Klenow 片段。用吸管吹吸，缓慢地将加入的各种试剂混匀。
4）室温放置 4～16 h（参见注释 5）。

探针标记完毕后即可使用。记住杂交前须再次将探针变性（参见注释 6 和 7）。

4. 注　　释

(1) 用不止一种带有放射性磷的核苷三磷酸进行标记可以得到较高比活的探针。当然如果使用四种放射性的核苷酸进行标记也是可以的，不过用本方法已经能得到较高比活的探针，只有在极少数的情况下才须考虑用 4 种放射性标记的核苷三磷酸。
(2) 现在很多厂商都提供随机引物法标记 DNA 的试剂盒，这些试剂盒使用起来既方便又高效。
(3) 以上步骤是对已纯化的 DNA 而言的。大多数实验中从制备胶中回收的部分可以不必再次进行纯化，在这种情况下可在每克含 DNA 片段的胶片中加入 3 ml 灭菌蒸馏水并煮沸 7 min 使其变性，同时胶亦熔化。分装成数小管后于 −20℃ 贮存（临用前须再次煮沸 3 min）或立即使用。
(4) 制备探测高丰度 DNA 的探针时随机引物法标记反应的量可比以上介绍的量减少一半。
(5) 为了操作方便可以标记过夜（12～16 h），但实际上反应进行到 4 h 时已有 70% 的放射活性掺入到 DNA 链中去了。
(6) 探针通常不用纯化。如果反应进行得较好约有 70% 被标记上。探针虽然可用葡聚糖凝胶（Sephadex）离心柱纯化，但未掺入的标记物并不会影响以后的杂交反应(参见第四十九章)。
(7) 掺入放射性的比活可按下法测定：将一部分标记反应物稀释成每 1～10 μl 中含有 10^4～10^5 dpm 的溶液（50 μCi = 1.1×10^8 dpm），然后点样在两张 Whatman DE81 膜上。其中的一张依次用 0.5 mol/L Na_2HPO_4 洗涤五次，水洗二次，95% 的乙醇洗涤一次。两张膜待干后放在液闪溶液中在液闪计数器上计数。未洗涤一张所计的数值是全部的放射性强度（因此可用于校正液闪仪的计数效率），洗涤过的一张便是掺入到探针中的放射性强度。

参 考 文 献

1. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6–13.
2. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity (Addendum). *Anal. Biochem.* **137**, 266,267.

第六章　Southern 印迹的杂交和竞争性杂交

Rosemary E. Kelsell

1. 引　　言

有关 DNA 的酶切产物经电泳分离后转移到固相支撑物（或膜）上的详细内容已载在第三、四章中，本章的内容是用互补的标记探针检测特异性的 DNA。这个方法可检测不同浓度的 DNA，甚至可以检测到哺乳动物基因组中的单拷贝基因（DNA 总量为 10 μg中含有略多于 1 pg 的可杂交 DNA）。

从理论上讲杂交包括标记的单链 DNA 探针与固定于膜上的变性 DNA 的复性过程。在实际操作中须要取得最大杂交信号与最小非特异性背景的一个平衡点。很多因素会影响杂交信号的强度，探针的长度与杂交液的离子强度对于决定复性速率是极为重要的，当探针的长度约为 200 bp 并且杂交液的离子强度较高时，可以得到最佳结果。最重要的因素是 DNA 浓度（C_0）和复性时间（t），按照 C_0t 关系很难预测到精确的杂交动力学，尽管在膜上杂交时复性反应中的一方是固定的。从理论上来说高的探针浓度与长的杂交时间能得到最强的杂交信号，但不幸的是这样的条件也同时会使背景加深，所以必须有一个折衷的办法。杂交液的体积必须控制得越小越好，但同时必须使膜在任何时间都浸泡在溶液中。加入 10%的硫酸葡聚糖也能增加探针的有效浓度，从而使杂交速率提高 10 倍[1]。但要注意使硫酸葡聚糖彻底溶解，否则反而会造成高本底。杂交时间应控制得尽可能地短。合适的杂交时间大约是 3 倍 C_0t 的时间，检测基因组中单拷贝组分时须杂交 12～16 h。用双链 DNA 片段制备探针时，即使再延长时间作用也不大，因为自我复性作用使得在这样长时间后杂交液中只剩下极少量的游离探针。杂交时加入一些封阻剂可抑制非特异性背景的产生，例如以下三种试剂，但往往组合应用：

① 润湿剂，常用 SDS。

② 阻止膜表面非特异性结合的试剂，最常用的是 Denhardt 氏溶液[2]。

③ 抑制非特异性复性试剂，通常用变性的 DNA 片段。

为了进一步抑制背景的产生，在用探针进行杂交之前先要进行预杂交。

背景的产生也可以是非常特异性的，原因可能是探针中混有其他的序列，但更重要的是基因组 DNA 杂交时的探针中含有重复序列。这些序列以不同的大小与频度广泛分布在所有的真核生物的基因组中。例如人类基因组中 *Alu* 重复序列平均每隔 5 kb 出现一次[3]，这说明如果从完整 λ 或黏粒所克隆的基因组 DNA 制备长的探针，它将与基因组的许多部位杂交，造成一片模糊而将单拷贝序列的信号掩盖掉。解决这个问题的一个方法是采用 DNA 片段的亚克隆制备探针，这样能保证对独特 DNA 序列的杂交，只是

亚克隆操作既困难又费时。竞争杂交技术能直接除去重复序列，该技术须要预先在溶液中使标记探针与已剪切的基因组 DNA 进行预复性，这时探针 DNA 中所有的重复序列都已与作为竞争物的 DNA 发生复性，使得 Southern 杂交时只剩下独特的序列与膜上的 DNA 进行杂交。

竞争杂交对于研究基因组 DNA 中的大片段是非常有用的，例如使用长探针可以加速鉴定与疾病有关基因的限制性片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism，RFLP）标记[4,5]，对于黏粒和 λ 克隆的更为快速的鉴定在制作长距离物理图谱方面[6,7]都是有用的，不论是分析野生型基因组的结构还是对大范围的染色体重排，例如缺失[5,8,9]所形成的交界片段的鉴定都适用。此外利用生物素标记的黏粒克隆进行荧光原位杂交对染色体水平的基因扩增机制研究的结果，说明这一技术显然已经达到在细胞分裂中期检测单拷贝的灵敏度[10]。

预复性步骤的条件与温度、时间、离子强度以及 DNA 的复杂程度有关，已经研究出多种预复性条件[4,11,12]。本章所介绍的方法是根据 Sealey 等人的工作[13]。第 3.2 节中所载的实验步骤已成功地用于竞争各种 λ 克隆制备的探针中的重复序列，对不论是用脉冲电泳还是用常规的琼脂糖电泳所制备的印迹膜进行探测。

2. 材　　料

所有常规的分子生物学级试剂均可从 BDH 化学药品有限公司（UK）或 Fisons 公司（UK）采购。所有的溶液用灭菌蒸馏水并按分子生物学的要求配制。

2.1 杂交（参见注释 1）

1）20×SSC：3 mol/L NaCl，0.3 mol/L 柠檬酸钠、pH 7.0，贮存于室温。
2）100×Denhardt 氏溶液：2%（w/v）BSA（组分 V，Sigma [UK]），2%（w/v）聚蔗糖（Sigma），2%（w/v）聚乙烯吡咯烷酮（Sigma），贮存于 −20℃。
3）10%SDS：贮存于室温。
4）10 mg/ml 鲑鱼精子 DNA（Sigma）：将 DNA 溶于水中，通过超声波法或连续 12 次地通过一个 17 号的注射针头剪切 DNA，煮沸 15 min 后贮存于 −20℃。
5）预杂交溶液：3×SSC，10×Denhardt 氏溶液，0.1%（w/v）SDS 与 50 μg/ml 的鲑鱼精子 DNA。预杂交液可配成母液并贮存于 −20℃。
6）标记探针（参见第五、七、八、十一、十二章）：100 ng 标记的探针（参见注释 2～4）在 3× SSC 溶液中平衡过的 Sephadex G50 离心柱中纯化（参见注释 5）。
7）杂交液：预杂交液中溶入 10%（w/v）的硫酸葡聚糖（Pharmacia，UK）。将硫酸葡聚糖溶于 65℃ 的预杂交液中，不时剧烈地摇动数次。杂交液要在杂交进行前几小时配制，以留有足够的时间使硫酸葡聚糖溶解，未溶解的硫酸葡聚糖会造成点状背景。杂交液可配成浓缩液于 −20℃ 贮存。
8）杂交炉与杂交管：作者发现使用杂交管进行实验十分方便。在这个装置中将膜铺在玻璃管的内壁，管子置于杂交炉中的旋转圆筒上，用这个装置可以很方便地更换溶

液并且可以将杂交液的体积控制得非常之小。这些装置可以购买到(例如 Hybaid Ltd, UK 与 Techne, UK)或是自制。其他的一些系统也能很好地用于杂交但却较难装置。另一种常用的方法是在浸于水浴中的封闭杂交袋中进行杂交(参见注释6)。

9）洗涤液：用贮存液配制 3 L 的 3×SSC，0.1%（w/v）SDS，和 3 L 的 0.1×SSC，0.1%（w/v）SDS。

10）合适的放射自显影胶卷：例如柯达 X-OMAT AR。

11）探针洗涤液

a. 500 ml 的 0.4 mol/L NaOH。

b. 0.1×SSC，0.5%SDS，0.2 mol/L Tris-HCl，pH 7.5。

2.2 竞争杂交

1）寡核苷酸标记终止缓冲液：20 mmol/L NaCl，20 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，2 mmol/L EDTA、pH 8.0，0.25%（w/v）SDS，1 μmol/L dCTP。

2）竞争物 DNA：20 mg/ml 溶于 TE 的剪切过的基因组 DNA（合适品种或合适类型的 DNA)，可用下法制备：基因组 DNA 溶解于适量的体积后以 5 s 的间隔超声振荡 20～30次，用琼脂糖凝胶电泳检测相对分子质量的大小，合适 DNA 片段的大小应是平均 500 bp。用酚/氯仿与氯仿各抽提一次后乙醇沉淀。用分光光度计测定浓度，最后将浓度调节至 20 mg/ml。

3. 方　　法

3.1 杂　　交

1）2×SSC 淋洗膜后置于合适的容器中（例如杂交管中）并加入 10 ml 左右的预杂交液（参见注释 7)，于 65℃ 转动或摇动 3～4 h（参见注释 8)。

2）临用前将探针煮沸 5～10 min 使探针变性（参见注释 4)，立即加入到 65℃ 预热的 10 ml左右的杂交液中（参见注释 9)。

3）倒去预杂交液并加入完成的杂交液，如果使用杂交管，那么这两步操作都很方便。65℃ 旋转（用杂交管）或摇动过夜。

4）杂交结束时取出膜（参见注释 10)，放入 500 ml 3×SSC，0.1%SDS 的溶液中于室温洗涤 1 min 以洗去未杂交上的探针 DNA。重复两次。

5）将膜放入 500 ml 65℃ 预热的 3×SSC，0.1%SDS 溶液中洗涤 10 min。重复二次（参见注释 11)。

6）将膜放在 500 ml 65℃ 预热的 0.1×SSC，0.1%SDS 溶液中洗涤 15 min。重复一次（参见注释 12)。

7）从洗涤液中取出膜置于聚乙烯膜上或聚乙烯袋中，如果可能的话将袋封住。勿令膜干燥，否则从膜上取下探针再次杂交或洗涤将是非常困难的。

8）如果使用 ^{32}P 标记的探针，令膜放射显影 2～24 h（参见注释 13)，如需长时间曝光，

可将膜放置两周。

9）同一张膜上的第一个探针经洗涤除去后可用第二个探针进行杂交。将膜于42℃中在500 ml 0.4 mol/L 的 NaOH 中放置 30 min 后转移到 0.1 × SSC，0.5% SDS，0.2 mol/L Tris-HCl、pH 7.5 的溶液中再放置 30 min。膜可以再次进行 X 射线底片的曝光，用以检测是否除尽了探针，最后贮存于 4℃ 的预杂交液中备用。本文作者在下一次使用此膜前通常加入新鲜的预杂交液。

3.2 探针的竞争杂交

1）用寡核苷酸标记的终止缓冲液将标记探针的体积调节到 200 μl。加入 150 μl 寡核苷酸标记的终止缓冲液后，探针经过 Sephadex G50 离心柱一般能回收约 50 μl（参见注释 5），加入 50 μl 20 mg/ml 的竞争物 DNA 与 50 μl 的 20×SSC。

2）混合物放入沸水浴中 10 min 进行变性，然后立即置于冰浴中 1 min。

3）反应液在 65℃ 中放置 10 min（参见注释 14 与图 6.1）。

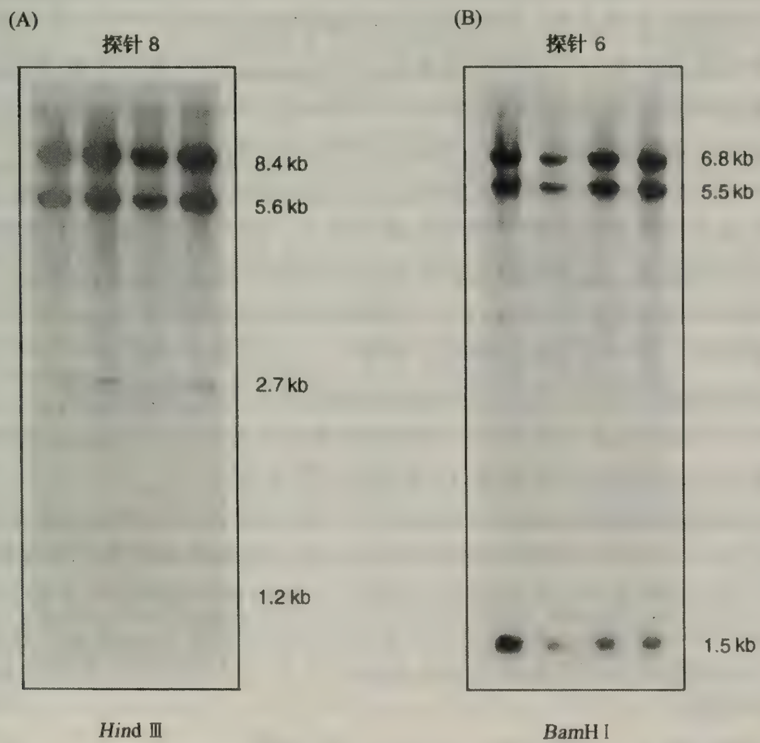


图 6.1（A）以^{32}P 标记的约 15 kb 长的 λ 克隆为探针，用 3.2 节中介绍的竞争杂交方法与 *Hin* dⅢ酶切的 CHO 基因组 DNA 杂交。在这探针所覆盖的 DNA 区域内至少可见 4 个等同于 *Alu* 的重复序列（探针 8，Davis 与 Meuth，参考文献 9）。（B）用另外一个^{32}P 标记的 λ 克隆作为探针与 *Bam* H Ⅰ 酶切的 CHO 基因组 DNA 杂交（探针 6，Davis 与 Meuth，参考文献 9）。在这一实例中重复序列与探针的竞争并不像前一个实例中那样成功。

4）在杂交液中加入这一经竞争处理过的探针，接着按 3.1 节第三步进行操作（参见注释 15 与 16）。

4. 注　　释

（1）其他的溶液同样能很好地用来进行杂交（例如 10%的 SDS 与 7%的 PEG 6000 无论对尼龙膜的预杂交还是杂交都适合——David Kelsell，未发表）。作者所用的膜是质量很高的尼龙膜（例如 Genescreen 或 Genescreen plus，NEN DuPont，UK），膜上的探针去除后，可用于其他探针的重复杂交。

（2）使用随机引物法能方便地得到比活大于 10^9 cpm/μg 的 DNA 双链标记探针。

（3）通常在制备探针 DNA 时不必将载体序列除去，只要在进行毛细管转移前将能与相对分子质量标准进行交叉杂交的泳道从胶上切除。例如 λ 克隆的臂在杂交时会与 λ 相对分子质量标准杂交，质粒中的某些序列则会与 1 kb 的梯度相对分子质量标准（Gibco-BRL，UK）中的某些条带发生杂交。

（4）当使用放射性标记的探针时要多加小心。作者在处理放射性标记的探针时使用 1.5 ml 的螺口盖离心管，以防止变性过程中盖子弹开。

（5）可以使用商品的离心过滤柱，但实际上 Sephadex G50 离心柱既便宜又便于制作。柱的制备可按第四十九章所介绍的，不同的是用 3×SSC 而不是用 TE 来平衡柱。装柱必须在临用前进行，并且不能让柱中的缓冲液流干。

（6）在袋中进行杂交时须将膜封入袋内，但注意要将封口处做成漏斗状。含探针的杂交混合液可以通过这个漏斗状的口倒入袋中。用一根 10 ml 的一次性移液管将气泡赶到袋的顶部，这样可以比较容易地将气泡从漏斗中赶出。用这个方法可以在最少溢出的情况下将袋封牢。可以先用装水的空袋进行练习。

（7）按一般准则，每平方厘米的膜至少要用 0.2 ml 的预杂交液。

（8）预杂交可以进行过夜，但是会降低膜的强度并有可能使信号减弱。

（9）浓度为 1～10 ng/ml 的探针杂交时信噪比最佳。如果用 10 ng/ml 的探针杂交产生高背景时可以将探针浓度稀释 10 倍后再试行杂交。

（10）探针可以贮存起来再次使用。放射性同位素标记的探针贮存时间与半衰期有关，^{32}P的贮存时间为两个星期。对于非放射性标记的探针来说就不存在贮存时间的问题了。由于探针分子在杂交时会自我复性，所以再次使用前须煮沸 15 min。

（11）这是低严格性的洗涤，探针可以与相似的（同源的）以及完全一样的序列结合。这时可以进行放射自显影以检测这些相关序列。低盐溶液的连续洗涤可以提高洗涤的严格性。

（12）这是严格的洗涤，只能检测到与探针全同的序列。

（13）放射自显影的灵敏度与曝光的条件有关。用装有橙色滤色片的闪光枪预先对底片进行一次曝光（<1 ms）可使底片的灵敏度提高二倍，并且与放射性的强度呈线性关系。此外在底片的后面放上增感屏并在 −70℃ 进行放射自显影时可使灵敏度提高 10 倍，但分辨率有所下降[14,15]。

（14）10 min 的预复性时间已经足够。但是如果放射自显影后仍然出现重复序列的条带，如图6.1(B)，就须核实所用剪切的基因组 DNA 是否足够。过高地估计剪切

基因组 DNA 的浓度是产生这一问题的常见原因，如果仍不能解决问题的话，可将预复性时间延长至 1 h。

(15) 本文作者和别人都发现 Southern 杂交时竞争探针会产生比单拷贝探针更强的信号，原因可能是探针过长所引起。

(16) 本文作者用这个方法曾观察到过 600～7000 bp 长的片段。

参 考 文 献

1. Wahl, G. M., Stern, M., and Stark, G. R. (1979) Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzyloxymethyl-paper and rapid hybridization by dextran sulphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76,** 3683–3687.
2. Denhardt, D. T. (1966) A membrane filter technique for the detection of complementary DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **23,** 641–646.
3. Deininger, P. L. (1989) SINES: short interspersed repeated DNA elements in higher eukaryotes, in *Mobile DNA* (Berg, D. E. and Howe, M. M., eds.), American Society for Microbiology, Washington, DC, pp. 619–636.
4. Litt, M. and White, R. L. (1985) A highly polymorphic locus in human DNA revealed by cosmid-derived probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82,** 6206–6210.
5. Blonden, L. A. J., den Dunnen, J. T., van Paassen, H. M. B., Wapenaar, M. C., Grootscholten, P. M., Ginjaar, H. B., Bakker, E., Pearson, P. L., and van Ommen, G. J. B. (1989) High resolution deletion breakpoint mapping in the DMD gene by whole cosmid hybridization. *Nucleic Acids Res.* **17,** 5611–5621.
6. Compton, D. A., Weil, M. M., Jones, C., Riccardi, V. M., Strong, L. C., and Saunders, G. F. (1988) Long-range physical map of the Wilms' tumor-aniridia region on human chromosome 11. *Cell* **55,** 827–836.
7. Compton, D. A., Weil, M. M., Bonetta, L., Huang, A., Jones, C., Yeger, H., Williams, B. R. G., Strong, L. C., and Saunders, G. F. (1990) Definition of the limits of the Wilms tumor locus on human chromosome 11p13. *Genomics* **6,** 309–315.
8. Blonden, L. A. J., et al. (1991) 242 breakpoints in the 200-kb deletion-prone p20 region of the DMD gene are widely spread. *Genomics* **10,** 631–639.
9. Davis, R. E. and Meuth, M. (1994) Molecular characterization of multilocus deletions at a diploid locus in CHO cells: association with an intracisternal-A particle gene. *Somat. Cell. Mol. Genet.* **20,** 287–300.
10. Smith, K. A., Gorman, P. A., Stark, M. B., Groves, R. P., and Stark, G. R. (1990) Distinctive chromosomal structures are formed very early in the amplification of CAD genes in Syrian hamster cells. *Cell* **63,** 1219–1227.
11. Ardeshir, F., Giulotto, E., Zieg, J., Brison, O., Liao, W. S. L., and Stark, G. R. (1983) Structure of amplified DNA in different Syrian hamster cell lines resistant to *N*(phosphonacetyl)-L-aspartate. *Mol. Cell. Biol.* **3,** 2076–2088.
12. Djabali, M., Nguyen, C., Roux, D., Demengeot, J., Yang, H. M., and Jordan, B. R. (1990) A simple method for the direct use of total cosmid clones as hybridization probes. *Nucleic Acids Res.* **18,** 6166.
13. Sealey, P. G., Whittaker, P. A., and Southern, E. M. (1985) Removal of repeated sequences from hybridization probes. *Nucleic Acids Res.* **13,** 1905–1922.
14. Laskey, R. A. and Mills, A. D. (1975) Quantitative film detection of ^{3}H and ^{14}C in polyacrylamide gels by fluorography. *Eur. J. Biochem.* **56,** 335–341.
15. Laskey, R. A. and Mills, A. D. (1977) Enhanced autoradiographic detection of ^{32}P and ^{125}I using intensifying screens and hypersensitive film. *FEBS Lett.* **82,** 314–316.

第七章　Southern 杂交中地高辛修饰的核苷酸标记 DNA 探针的应用

Tim Helentjaris，Tom McCreery

1. 引　　言

无论是用地高辛还是生物素标记的探针都可以用来进行 Southern 印迹杂交以检测目标核苷酸序列，这些方法在安全性、价格与效率等方面都优于放射性同位素标记的方法。以前使用的非同位素标记方法大多是利用偶联有抗体或抗生物素蛋白（avidin）的磷酸酯酶来检测经修饰的碱基，用氮蓝四唑（Nitro Blue Tetrazolium，NBT）显色，氮蓝四唑转变成不溶于水的有色物质，沉淀在杂交的原位。用化学发光物质取代这种颜色反应能提高检测灵敏度，并且更便于将膜再次用于杂交。发光化合物例如（adamantyl 1，2 dioxetane phosphatase，AMPPD）[1]是一种使用很方便的底物，因为它被碱性磷酸酯酶分解发出光线，直接使标准的 X 射线底片曝光。类似于用 NBT 检测法制备的探针同样适用于这一方法。结合有碱性磷酸酯酶的膜浸在含有 AMPPD 的稀溶液中后即可于室温或 37℃，而不是 −70℃进行曝光。对于检测甚至是器官中提取的大基因组 DNA 中的单拷贝，曝光时间都只需从 45 min 至几个小时不等。现在又有了具有更高灵敏度与更长发光时间的底物，例如 CSPD、CDP 与 CDP☆（Tropix，Bedford，MA）。这些底物的使用方法与 AMPPD 完全相同。

本方法所需要的探针很容易用两种方法中的一种来制备。尽管以前的各种方法都是利用放射性掺入的机制来修饰核苷酸，但是现在用随机六核苷酸引物标记寡核苷酸却是得到高度特异性的 DNA 杂交探针的有效方法[2]。早期的研究报道 DNA 聚合酶 I 可以将地高辛-11-dUTP 作为底物掺入到 DNA 双链中去[3]。我们同样发现只要对我们以前的方法稍加改进就能使地高辛掺入的探针在 Southern 杂交中检测到极少量的目标 DNA（1 pg 或更少）。这个技术尤其能有效地标记从低熔点琼脂糖凝胶中分离出来的 DNA 片段以及对于不适用 PCR 方法的 DNA 片段进行标记（参见注释 1）。

DNA 聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）[4]是利用位于两侧的引物有效地拷贝出 DNA 片段的一种有效方法。大部分克隆载体都利用带有多克隆位点[5]的 *lac*Z 基因，所以只需要一对引物就可以扩增插入到 λ 噬菌体系列或 pUC 质粒系列及其衍生物中的很多序列。我们在扩增大于 3000 bp 长度的插入片段时几乎没有什么困难，因此我们现在认为在定位和测序的工作中，可以用这一方法来代替通过细菌培养和纯化来提供这样长度的 DNA 的方法。由于 *Taq* DNA 聚合酶能在产物中掺入地高辛-11-dUTP，所以 PCR 法是一个制备探针的首选方法，它具有以下优点：

① 只需少量的模板 DNA 就能产生大量的产物；

② 模板 DNA 可以从已纯化的 DNA（超螺旋或线型分子）或者是含有质粒的细菌

培养物或感染有噬菌体的细菌裂解液中得到；

③ 通过标准的琼脂糖凝胶电泳监察双链 DNA 的形成，很容易判断标记反应的进行程度。

PCR 标记法也有以下缺点：

① 目标序列必须克隆到某种载体上，这种载体的两侧引物或基因专一的引物都是可以得到的；

② 在扩增大于 3000 bp 的长度时经常会碰到困难；

③ 即使当长度小于 3000 bp 时也可能因高 GC 比或是形成折叠结构而造成扩增困难。

不过我们发现这个方法尤其适用于寡核苷酸的标记，并且我们经常会尝试应用于任何 DNA 模板，直到在实验中碰到困难为止。非放射性物质修饰碱基的方法要比放射性物质修饰的方法价格低廉，并且产物的稳定期也大大长于 ^{32}P 标记的探针。通过以上提供的两种经济而又安全的标记方法都能制备出足以检测出非常复杂的基因组中的单拷贝序列的探针。

2. 材　　料

2.1　寡核苷酸标记

所有寡核苷酸标记试剂均贮存在 −20℃，临用前在冰浴中解冻。

1）溶液 O：44.52 g Tris，7.47 g $MgCl_2$ 溶于 150 ml 水中，用 HCl 将 pH 值调节到 8.0 后定容至 250 ml。

2）溶液 A：18 μl β-巯基乙醇，25 μl 100 mmol/L dATP，25 μl 100 mmol/L dCTP，25 μl 100 mmol/L dGTP，4 μl 100 mmol/L dTTP，溶于 899 μl 的溶液 O 中（参见注释 1）。

3）溶液 B（2 mol/L HEPES）：119.15 g HEPES 溶于 100 ml 水中，用 4 mol/L NaOH 将 pH 值调节到 6.6 后定容至 250 ml。

4）溶液 C：将 555 μl 的水加到 50 U 的随机六核苷酸混合物中（Pharmacia，Uppsala，Sweden）。

5）5×寡核苷酸缓冲液：将溶液 A，B 与 C 以 1.0∶2.5∶1.5 的比例混合。

6）BSA：10 mg/ml，贮存于 −20℃。

7）地高辛-11-dUTP：将 37.5 μl 的水加到 25 μl 1 mmol/L 的母液中（Boehringer Mannheim，Mannheim，Germany），使其形成 400 μmol/L 的浓度。

8）从大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 中得到的 Klenow 片段：用 7 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，7 mmol/L $MgCl_2$，50 mmol/L NaCl，50％的甘油将酶的母液稀释至 1 U/μl。

2.2　PCR 法标记

1）10×PCR 缓冲液：将 3.7 ml 灭菌蒸馏水，5.0 ml 500 mmol/L KCl，1.0 ml 1 mol/L Tris-HCl、pH 8.2，0.2 ml 1 mol/L $MgCl_2$ 和 0.1 ml 1%的明胶混合。

2）dXTPs：配制含有 2.5 mmol/L dATP，dGTP，dCTP 与 dTTP 的混合溶液。

3）引物：对每一个反应引物可以是特异的（通常是随载体而异，参见注释 2），但是我们在扩增 pUC 载体中的插入片段或是其他带有具多克隆位点的 *lac*Z 的载体时，使用了同一对引物。

100 μmol/L　PCRFSEQ：5′ TTGTA　AAACG　ACGGC　CAGTG　3′

100 μmol/L　PCRRSEQ：5′ GGAAA　CAGCT　ATGAC　CATGA　T　3′

将这些引物以 1∶1 的比例混合，得到每个引物浓度为 50 μmol/L 的溶液。

4）*Taq* DNA 聚合酶：厂商以 5 U/μl 的浓度供应。

5）1×标记反应液：每个样品需要 24 μl 的这种混合液。将 19 μl 灭菌蒸馏水、2.5 μl 10×PCR 缓冲液、0.5 μl 2.5 mmol/L dXTP、1.0 μl 稀释的地高辛-11-dUTP（参见注释 3）、0.5 μl 混合的引物与 0.1 μl *Taq* 聚合酶混合。

6）矿物油：我们使用的是从市场上购买的 USP 级的重矿物油。

2.3　化学发光检测

1）转移膜：像放射性标记检测法那样准备膜，非常重要的一点是必须戴上手套或用镊子处理胶或膜，因为膜上的指痕不能被除去并且会在以后的显色过程中造成明显的污迹。当使用 AMPPD 显色时只能使用尼龙膜，因为 AMPPD 在尼龙膜内是稳定的，如果使用硝酸纤维素膜或 PVDF 膜就会达不到同样的检测灵敏度。

2）预杂交/杂交缓冲液：5×SSC，0.1% *n*-十二烷酰肌氨酸钠（粉末型），0.02%十二烷基硫酸钠（sodium lauryl sulfate，SDS），0.1%封阻试剂（Tropix 或 Boehringer Mannheim 出品），100 μg/ml 鲑鱼精子 DNA。

3）洗涤液：0.1×SSC、0.1% SDS。

4）缓冲液Ⅰ：0.05 mol/L Tris-HCl、pH 7.5，0.15 mol/L NaCl。10×的母液要提前配制并经高压灭菌，临用前稀释。

5）封阻缓冲液（缓冲液Ⅱ）：缓冲液Ⅰ中含有 0.1%的封阻剂。缓冲液Ⅱ早一天配制对工作有利。将配制溶液的一部分于 65℃保温过夜以保证封阻剂彻底溶解。

6）抗地高辛溶液：含有 2.5 μl 的抗地高辛抗体/碱性磷酸酯酶结合物（Boehringer Mannhein＃1093 274）与 50 μl 的封阻缓冲液。溶液必须在临用前配制。

7）1 mol/L Tris-HCl，pH 9.5，高压灭菌。

8）1 mol/L $MgCl_2$，高压灭菌。

9）5 mol/L NaCl，高压灭菌。

10）缓冲液Ⅲ：0.1 mol/L 二乙醇胺（2.4 ml/250 ml 终溶液）、1 mmol/L $MgCl_2$、0.02%叠氮化钠，用浓 HCl 将 pH 值调节到 10.0。

11）AMPPD 溶液：每毫升缓冲液Ⅲ中加入 2 μl Tropix AMPPD。估计大约 2.5 ml 足够对 10 cm×10 cm 的印迹膜显色，按比例配制所需的量。未稀释 AMPPD 的保质期约为 3 个月。
12）脱色溶液：同洗涤液。
13）标记的相对分子质量标准（参见注释 4）。

3. 方　　法

3.1　寡核苷酸标记

1）50～500 ng DNA（从载体上切下，用合适的方法从琼脂糖凝胶上分离得到，参见注释 5）加入到装有 18 μl 水的 0.65 ml 的微型离心管中。
2）将 DNA 在 95℃ 热变性 10 min。
3）立即将变性 DNA 的小管放在冰上冷却。
4）立即加入下列试剂并充分混合：5 μl 5×寡聚核苷酸缓冲液，0.5 μl BSA，0.5 μl 地高辛-11-dUTP，1 μl Klenow 片段。
5）37℃ 保温 90 min～18 h（看来 3 h 的标记已经充分）。

探针可立即使用或贮存后备用。如在数周内使用可保存于 4℃，如长期中使用则可在 -20℃ 贮藏（参见注释 6 和 7）。

3.2　PCR　标　记

PCR 扩增的条件随着使用引物的不同而异。我们发现提高复性温度有利于富含 GC 的模板的扩增，为此推荐应用复性温度至少为 60℃ 或更高的引物。PCR 循环包含有三步：第一步是变性，即将双链 DNA 分离成二条单链；第二步是复性，引物与单链模板 DNA 相互结合；第三步才真正是扩增，即 *Taq* DNA 聚合酶复制模板 DNA 序列。典型的扩增程序是 95℃、2 min，60℃、30 s 与 72℃、3 min。这个循环过程中 95℃ 的时间较长，目的是对模板 DNA 在开始时就进行高效变性。接下来是 18 个下列循环：95℃、30 s，60℃、30 s 与 72℃、3 min。最后一个循环为 95℃、30 s，60℃、30 s 与 72℃、10 min，目的是提供一个长时间的扩增步骤，有助于最后完成那些以前已经起始（但尚未完成）的反应产物。完成反应后在热循环仪中 6℃ 保温 18 h，这样便于放置过夜于翌晨继续操作。

1）1 ml 过夜培养的感染有 λ 噬菌体的裂解液（参见注释 8）或是 1～10 ng 的模板 DNA（参见注释 9）加入到 65 μl 的微型离心管中或是能在热循环仪中使用的 96 孔板的一个孔中。
2）全部所需的混合液一次配制，然后每次取出 24 μl 与每个小管中的液体混合。用微量移液器吸放数次借以混匀。
3）在混合物置于管中后加入 2 滴矿物油以防止在热循环仪中进行扩增过程中液体的蒸

发。
4）将小管或孔板放在热循环仪内开始执行程序。
5）在最后的 72℃ 延伸步骤完成后即可取出小管，也可于仪器上 6℃ 保存过夜。取下小管后用微量移液器将下层的水相吸出，转移到干净的小管中。

随着目标 DNA 片段大小的不同，PCR 反应的预期产量也在 500～1000 ng 之间变动。如须准确测定这个反应的产量可取 4 μl 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析，如需更多产物只要将规模放大便可。用本方法标记的探针贮存于 －20℃ 可保持稳定数月甚至更久。

3.3 化学发光法检测

1）以每 100 cm^2 膜面积使用 3 ml 预杂交液计算，在塑料盒或杂交炉中于 60～65℃ 进行 1 h 或更长时间的预杂交。
2）将探针进行 95℃、10 min 的变性处理。杂交液中加入终浓度为 5～20 ng/ml 的探针 DNA，通常每毫升杂交液中含有 2 μl 的探针时能产生很好的结果。
3）用含有变性探针的新鲜杂交液代替预杂交液，65℃ 保温 6 h 或过夜。除非同一容器中有几张膜同时杂交，不须在杂交过程中进行混匀。
4）倒出杂交液。（杂交液可于 4℃ 保存并重复使用数次而几乎不影响杂交信号的强度）。
5）用至少 200 ml 洗涤液在良好的搅动条件下于室温洗涤二次，每次 3 min。
6）用至少 200 ml 洗涤液在良好的搅动条件下于 65℃ 洗涤 30 min。这步的目的是除去任何未结合在膜上的探针 DNA。
7）用缓冲液Ⅰ在室温条件下洗涤 5 min（这步及以后的洗涤均在室温进行并且须剧烈摇动）。这步的目的是洗去膜上的洗涤液为封阻剂的作用做好准备。
8）用 200 ml 封阻剂处理 30 min。这步的目的是防止膜表面与非特异性的抗体结合。
9）用 200 ml 抗地高辛溶液处理 30 min。在这个过程中抗体/碱性磷酸酯酶结合物与膜上的地高辛标记的探针结合。
10）用 200 ml 缓冲液Ⅰ洗涤 3 次，每次 5 min。这步的目的是洗去未结合的抗体/碱性磷酸酯酶结合物。
11）用缓冲液Ⅲ洗涤 10 min 一次。这步的目的是保证 pH 值适合于酶与底物 AMPPD 作用。
12）从缓冲液Ⅲ中取出膜，置于与 X 线片盒大小一致的有机玻璃板上（不须要用增感屏）。小心地向每张膜上加上 2.5 ml 的 AMPPD 溶液，用 Saran Wrap™或 mylar[1]膜包好防止干涸。无论哪种方法都可用，只要方便。
13）37℃ 放置 3 h 或室温放置曝光过夜。曝光的时间取决于目标 DNA 序列的量、探针的标记强度以及探针的加入量。

1）疑是 nylon 之误。——译者注

杂交的结果应该是出现于干净背景上的清晰黑色条带（参见注释 10 和 11)。如须再次使用这张膜可将其置于沸腾的脱色液中洗涤 10 min 以除去探针 DNA。用 TE 洗涤除去脱色液后可于 4℃ 中短时间贮存，空气干燥后则可于 4℃ 中贮存数月（参见注释 12)。

4. 注　　释

(1) 标记反应中修饰碱基的量从 dTTP 总浓度的 20% 下降到 5% 时可降低背景，并且这样做还能增加标记反应的效率，充分利用最终产物。我们发现地高辛标记的探针在化学性质上与放射性标记的探针略有不同，原因可能在探针 DNA 的碱基上引入了长的侧链。在较低的杂交温度时它们能形成更加稳定的杂交产物，并且一旦杂交上后它们更难于从膜上除去。当 dUTP 的浓度小于 10% 时上述特性将受到极大的影响。

(2) 如果使用长的引物，PCR 反应的复性温度可以调得更高一些，我们曾尝试过用于 *lac*Z-MCS 载体的其他引物，发现下面这对引物能有效地进行扩增并且能使用较高的复性温度（高达 68℃）这样做还能增加 PCR 扩增序列的百分数。

FUPSTRM：5′ ATGTG　CTGCA　AGGCG　ATTAA　GTTGG　G 3′

RDNSTRM：5′ CACAC　AGGAA　ACAGC　TATGA　CCATG　3′

(3) 以上所介绍的操作步骤中要求标记碱基百分比为 5%。在这样的标记程度时大多数放射自显影谱都表现出低本底的强信号。标记浓度小于 2.5% 或大于 20% 都可用。

(4) 这个系统的与众不同之处是可以方便地在琼脂糖凝胶上使用地高辛标记的相对分子质量标准。我们认为用 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段对限制酶切割的黏性末端进行补平是制备相对分子质量标准极有效的方法，这样就在用碱性磷酸酯酶-抗地高辛结合物处理的过程中随时都可以看到相对分子质量标准。我们认为使用 Gibco BRL 公司（Gaithersburg，MD）的 1 kb 阶梯相对分子质量标准较好，因为这一相对分子质量标准已经具备了可以利用的末端并且产生每隔 1000 bp 一个条带的一组相对分子质量标准。

(5) 也可参照下列方法[6]从低熔点胶中分离得到 DNA 片段。在 4℃ 制备一块低熔点琼脂糖凝胶，点上样品后即于 4℃ 进行电泳分离以防止低熔点胶熔化。EB 溶液染色后，用手持长波紫外线灯确定回收片段的位置（长波紫外线可减少对 DNA 的损伤作用)。用刀片或吸管将胶取出，加入 2～3 倍体积的 TE 后于 65℃ 放置 5 min 使凝胶熔化。此溶液可用酚/氯仿抽提一次，但通常我们认为这一操作并无必要。

(6) 我们认为纯化标记的探针并非必需，不过也许能使 Southern 印迹膜上的背景稍有降低。我们认为乙醇沉淀是纯化地高辛标记探针的有效方法。加入 3 mol/L 的 NaOAc 使终浓度为 0.2 mol/L 并加入 3 倍体积的乙醇（100%)，混匀后于 −70℃ 放置 15 min。台式微型离心机离心 5 min 后弃上清液，用 700 μl 70% 的乙醇洗涤沉淀并离心 2 min。空气干燥沉淀。待彻底干燥后悬浮于 100 μl TE 中。

(7) 不幸的是没有一个检测探针中地高辛掺入程度的定量方法，缺乏用少量探针点在

膜上后经抗地高辛－碱性磷酸酯酶结合物来检测的方法。

(8) 用以下介绍的方法可以对 λ 噬菌体的裂解液用 PCR 法直接标记。制备噬菌体的方法与常规一样，不过倒平皿时上下层均用琼脂糖而不是琼脂，因为琼脂中的杂质会抑制 PCR 反应。挑取单个的噬菌斑转接到 0.65 ml 的小离心管或是 96 孔板中。每个噬菌斑中加入 100 μl 的 LB 培养液，37℃ 振荡培养过夜。在 PCR 小管或板孔中加入 1 μl 上述裂解液后按照标准 PCR 步骤进行扩增反应。

(9) 模板 DNA 浓度对于标记反应来说是起着决定性作用的，模板过量肯定是不好的。将模板 DNA 的浓度控制在接近 1 ng 时能得到具有高度特异性的最大量的标记探针。

(10) 如果最后的胶卷上的信号很弱或甚至是根本没有信号时，可能有以下几种原因：

a. 探针未制备好或是加入量过少。可以将探针在胶上检查标记是否成功以及产量如何。

b. 膜上基因组 DNA 浓度过低或是已经降解，这是一个相当常见的问题，可以尝试增加点样量，此外可以在低浓度的琼脂糖凝胶上电泳检查未经切割的 DNA 的质量。

c. AMPPD 放置过久或是已经降解。但如果相对分子质量标准可以观察到，那就不是这个问题了，应考虑存在其他的可能性。

d. 未加抗体或是抗体已坏。但如果相对分子质量标准可以显色的话也不是这个问题。如果相对分子质量标准同样不能看到，那就应该同时检查抗体结合物与 AMPPD 是否正常。

(11) 高背景也是这个技术中更经常碰到的问题，可能的情况有以下几种：

a. 膜上被污染了不易除去的指印。

b. 如果整张膜上出现均匀的灰色或是非常黑色的背景，通常是 AMPPD 过早分解所造成。如果是缓冲液Ⅲ制备不当或是 AMPPD 的母液已经分解，则会在整张膜上造成均一的本底，并且伴随着杂交信号的减弱。

c. 在不加探针的泳道上经常出现的点状污染物可能有不同的来源，这种现象说明抗体结合物与膜产生了非特异性的结合所致。我们发现曝光时如果膜放置在脏的有机玻璃上，就可能由于外源碱性磷酸酯酶或其他的污染物而使 AMPPD 分解。除此以外，这问题还经常与缓冲液Ⅱ有关，如果封阻剂没有充分溶解的话也会造成同样现象。

d. 如果在膜的其他部位背景清晰而在泳道上则背景极高，掩盖了所有的条带，说明问题出在探针的性质上而不用考虑反应的条件。解决这个问题的惟一实用方法是提高洗脱的严格程度（68℃，0.1×SSC）。

e. 处理膜时必须小心，不能用镊子刮擦膜的表面。这一点在使用放射性标记的探针时是不成问题的，但任何粗鲁的操作都会在膜上造成深色的背景。

(12) 前一次杂交时留下的“鬼带”：造成鬼带的原因是脱色过程进行得不彻底，可尝试再次进行脱色。如果仍无效，可能是杂交过程中使膜干涸所致。当探针仍与膜结合时不要使膜干涸，这样会使探针难于洗去而永远留在膜上。在曝光时注意封住袋口，当曝光结束立即从胶卷上取下杂交膜进行脱色处理。

致 谢

本工作部分受 USDA Hatch 项目（ARZT-136440-H-25-042）和 USDA NRI 竞争项目奖（91-37300-6453）所资助。许多方法由 Tropix 和 Boehringer Mannheim 提供，此外我们还得感谢 D. Hoisington 和其他许多人的建议。

参 考 文 献

1. Voyta, J. C. and Bronstein, I. (1988) Ultra sensitive detection of alkaline phosphatase activity. *Clin. Chem.* **34,** 1157.
2. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6–13.
3. Kreike, C. M., de Koning, J. R. A., and Krens, F. A. (1990) Nonradioactive detection of single-copy DNA-DNA hybrids. *Plant Mol. Biol. Rep.* **8**, 172–179.
4. Saiki, R. K., Scharf, S., Faloona, F. A., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction sites analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350–1354.
5. Vieira, J. and Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19**, 259–268.
6. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

第八章　荧光素标记核酸探针的制备及其碱性磷酸酯酶催化的二氧杂环烷化学发光反应检测

Martin Cunningham, Martin Harris

1. 引　　言

1.1　荧光素半抗原标记探针

非放射性物质标记核酸探针的方法通常是在核酸分子中引入诸如半抗原、生物素等惰性小分子。这些小分子一般通过接头连接到 dUTP 等核苷三磷酸上。这种经修饰的核苷三磷酸再通过酶促反应掺入到探针中，例如用于随机引物法标记长链探针或是通过末端转移酶标记寡核苷酸的 3′端。杂交后用与一种酶相连接的抗体（或者如果是生物素，则用链霉抗生物素蛋白，streptavidin）来检测。这种酶，如碱性磷酸酯酶或辣根过氧化物酶是用来催化所检测的反应的。可使用的半抗原有多种，最常用的是地高辛、生物素与荧光素。本方法比直接酶标法（参见第十章）步骤更多，因为其中包括膜的封阻、抗体的结合以及膜的洗涤等额外操作。但是它可以用在通过碱性磷酸酯酶催化底物二氧杂环烷（dioxetane）的高灵敏度化学发光检测上。还能用于寡核苷酸探针上，即通过偶联在探针上的辣根过氧化物酶催化的强化化学发光进行检测，利用了它的低本底与快速光输出的优点。方法详见第十一章。

荧光素作为半抗原用于核酸标记中有以下优点：

① 荧光素在杂交中很稳定，甚至在较高温度下。

② 荧光素核苷三磷酸可在 DNA 聚合酶作用下掺入到探针中去。

③ 针对结合物中的荧光素部分可以制备高亲和力的抗体。

④ 标记的探针不用纯化，因为当使用合适的封阻剂时这种探针与膜的亲和力很低。

⑤ 使用本系统时被抗体识别的内源性物质所干扰的机会很小，但在原位杂交中如用生物素则有干扰。

⑥ 荧光素用作半抗原的最后一个重要的优点是在杂交开始之前就可以知道探针标记反应能否成功，即通过快速（20 min）透射测定法测定所发出的天然荧光。监测探针标记的进程与用 β-计数器对 ^{32}P 标记的探针进行检测相类似，具体测定方法载在第九章中。

荧光素基因显影系统（fluorecein gene image system, Amersham International, Bucks, UK）就是用荧光素作为半抗原，通过碱性磷酸酯酶催化二氧杂环烷的化学发光

反应进行检测。通过由大肠杆菌的 DNA 聚合酶的 Klenow 片段所催化的随机引物标记反应[1]使荧光素-11-dUTP 掺入到 DNA 链中。在这个反应中 Klenow 片段特别有效，所以标记过程可以认为是一个净合成过程，例如 50 ng 的探针经 1 h 合成后可以得到 300 ng 的探针。标记的探针不经纯化即可直接用于杂交实验中（先进行变性处理）。杂交的严格性可通过杂交过程中盐离子浓度或温度的调节来控制，或/及通过严格性洗涤来控制。所推荐的探针浓度与 ECL 直接标记系统（第十章）相同：目标 DNA 较少时使用 10 ng/ml 的浓度；目标 DNA 较多时使用 2～5 ng/ml 的浓度。

如果在杂交阶段中以及在随后加入抗体结合物前的膜封阻步骤中使用的封阻剂是固体，就可能因封阻剂难于溶解而造成程度不同的各种背景。但也有封阻剂的浓缩液供应，这样就能保证试剂的一致性与杂交结果的低本底。使用这个系统时仔细配制抗体结合物能进一步降低本底，其中包括用优化的方法制备抗体结合物以及利用抗荧光素的单克隆抗体，这样的系统具有较高信噪比。

1.2　碱性磷酸酯酶催化的二氧杂环烷化学发光反应

碱性磷酸酯酶催化二氧杂环烷的衍生物分解所产生的化学发光为本系统提供了高灵敏度检测的基础。1，2-二氧杂环烷是环状过氧化物，分解后形成两个带有羰基的部分。其中一个开始形成时处在电子激活状态，当回到基态时就会发光[2]。含有一个金刚基的苯基磷酸盐取代的二氧杂环烷（4-［苯基-3-磷酸］-4-甲氧基螺旋［1，2-二氧杂环烷-3，2′-金刚烷］）（4-［phenyl-3-phosphate］-4-methoxyspiro［1，2-dioxetane-3，2′-adamantane］）已被证明在各种测定方法中具有特别的作用[3]。一般情况下它非常稳定，但在小牛肠碱性磷酸酯酶的存在下，会很快通过不稳定的二氧杂环烷的芳基氧化物转变为发光物质。

这一反应最大的光输出在 470～480 nm。在某些情况下，例如在溶液中测定时由于混杂有荧光基团（如荧光素）的表面活性剂或高聚物，光输出就会大大加强。这是因为它们可以被荧光中间体转移的能量所激活。如果使用从十六烷基三甲基溴化铵（cetyltrimethylammonium bromide，CTAB）和5-(N)-四癸酰-氨基荧光素所形成的荧光微团时，化学光发效率至少提高 400 倍[4]，最大光输出为 520～530 nm。直到近来才发现有些印迹膜，包括尼龙膜在内都能加强光的输出。

含有二氧杂环烷基团的化学荧光物质在杂交检测中具有特别高的灵敏度。尽管检测过程中用到的多种试剂都须优化，特别是抗体结合物与封阻剂，但仍能达到低本底的目的。此外溶液很容易被细菌碱性磷酸酯酶所污染，造成杂交膜上的污染斑点，所以无论何时在可能的情况下都应使用灭菌的溶液与干净的器皿。

与辣根过氧化物酶催化的光化学反应相反，标准的二氧杂环烷荧光反应开始时光输出很小，最大输出出现在几个小时之后。这一延迟是由于有着较短半衰期的芳氧中间产物的积累较慢的缘故，但是光输出可以在几天内都维持较高的水平而只有很少的衰减，这样就能在底片上进行最强的信号积累，这时灵敏度往往由曝光的背景干扰所限制。如有需要，利用光输出时间的延长可以进行多张底片的曝光。

由于方法的高灵敏度与二氧杂环烷化学发光物质的长时间发光特性，与辣根过氧化

物酶催化的化学发光法相比，电泳加样量更少，而检测到的核酸水平更低。使用这个系统做基因组杂交，人基因组 DNA 的电泳点样量为 0.2 μg 和探针为 1 kb 时，检测灵敏度至少可达 100 fg。这个系统也可用于许多 Northern 印迹中。作为一个粗放的准则：^{32}P标记探针杂交后少于 48 h 的曝光应该就可以得到可接受的结果。当然这个系统也能用于只要求低灵敏度的检测反应中。

2. 材　　料

荧光素基因标记与显影检测试剂盒（Amersham International, plc）提供标记和二氧杂环烷化学发光检测所需的组分。下面列出试剂盒中的各种组分以及须要配制的各种溶液。

2.1　标记探针的制备

1）核苷酸混合物的 5×贮存液：300 mmol/L Tris-HCl、pH 7.8，50 mmol/L 2-巯基乙醇，50 mmol/L $MgCl_2$ 的溶液中含有 5×荧光素-11-dUTP（Fl-dUTP），dATP，dCTP，dGTP，dTTP。这一混合物作为荧光素基因标记系统试剂盒供应。它已优化以得到高产量的探针和较高的荧光素掺入程度。
2）引物：随机九聚寡核苷酸。这些引物也由该系统提供，使用它所得到的探针 DNA 产量大于随机六聚寡苷酸引物。
3）酶溶液：5 U/μl Klenow 片段。也由该系统提供，可产生两倍于标准 Klenow 片段所产生的探针。
4）TE 缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，1 mmol/L EDTA。
5）0.2 或 0.5 mol/L EDTA，pH 8.0。

2.2　杂交与严格性洗涤

1）液体封阻剂：由上述试剂盒提供，用于推荐的杂交缓冲液以及用于加入抗体结合物前膜的封阻。
2）20×SSC：3 mol/L NaCl，0.3 mol/L 柠檬酸钠，pH 7.0。
3）10％或 20％（w/v）SDS。
4）硫酸葡聚糖：相对分子质量为 500 000，例如 Sigma 的产品 D-6001。如果要达到杂交最大灵敏度则须用硫酸葡聚糖作为加速剂。
5）杂交缓冲液：5×SSC，20 倍稀释的杂交封阻剂，0.1 %（w/v）十二烷基硫酸钠（SDS），5 %（w/v）硫酸葡聚糖，100 μg/ml 经剪切并变性的非同源 DNA，例如鲑鱼精子 DNA（自由选择）。

2.3 封阻、抗体保温与洗涤

1）抗荧光素-碱性磷酸酯酶结合物：上述系统提供的 5000×的贮存液。该结合物已经过调整，能在膜杂交过程中使背景降低。
2）缓冲液 A：100 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，300 mmol/L NaCl。以 500ml 的缓冲液分装在 1 L 的瓶中，以 105 kPa 高压灭菌 15 min，灭菌后一旦开瓶使用不可超过一天。
3）牛血清白蛋白（bovine serum albumin，BSA）组分 V：例如 Sigma 产品 A－2153 或 BDH 产品 44 155。
4）Tween－20（多聚氧乙烯山梨聚糖单肉桂酸酯）：例如 Sigma 产品 P－1379 或 BDH 产品 66 368。

2.4 信号的产生与检测

1）贮存于喷雾瓶中的二氧杂环丙烷检测试剂：由上述系统提供，可直接用于膜杂交实验中。使用这些试剂时最好在通风橱中进行。
2）检测袋：由上述系统提供的光学透明袋，用于使用检测试剂以及以后的底片曝光中。此外还可以用 Saran Wrap™膜。
3）放射自显影底片：大多数标准的放射自显影底片都适用于二氧杂环丙烷化学发光反应的检测，例如 Hyperfilm-MP™（Amersham International，plc）或 Kodak X-AR。

3. 方　　法

3.1 标记探针的制备

以下操作步骤可供标记 50 ng 的模板 DNA。标准的反应可用于标记 20 ng～2 μg 的模板 DNA。当模板 DNA 的量为 50 ng 时标记探针的合成效率最高，不过净合成仍随着模板 DNA 的增加而增加。

1）用蒸馏水或 TE 将模板 DNA 稀释成浓度为 2～25 ng/μl（参见注释 1）。
2）将核苷酸混合物、引物与水置于冰浴中化冻。酶在使用时方能从－20℃取出，用后立即放回冰柜中。
3）置 DNA 于沸水浴中保温 5 min 使 DNA 变性，然后立即置于冰水中。DNA 变性时的体积至少要达到 20 μl。
4）将 1.5 ml 的微型离心管置于冰浴中，依次向管中加入下列组分：核苷酸混合物 10 μl，引物 5 μl，变性 DNA 50 ng，浓度为 5 U/μl 的 Klenow 片段 1 μl，加水至终体积为 50 μl。
5）用吸嘴缓慢吸放数次混匀，盖上盖子后在微型离心机中稍事离心，使内容物集中到底部。

6）将反应混合物于37℃保温1 h（参见注释2）。

7）如果探针须要贮存而不是立即使用时，反应混合物中须加入终浓度为20 mmol/L的EDTA以终止合成反应。探针于－20℃暗中保存至少可达6个月（参见注释3），切不可放入自动化霜的冰箱。

25 ng或50 ng的模板DNA经标记反应后，比较典型的探针得率为6～8 ng/μl，当使用较多的模板时探针的总量虽会增加，但标记的效率却不高。这时可用快速标记检测法检测探针是否标记成功（参见第九章）。

3.2 杂交与严格性洗涤

下面介绍的杂交与洗涤条件适用于大多数探针，可以用来检测到哺乳动物基因组中单拷贝基因，而不发生与非同源性序列明显的交叉杂交反应。但是如果这些洗涤条件对于某些特定的探针还不够严格，可以将杂交膜置于60℃的0.2×或0.1×SSC中洗涤。此外将杂交或洗涤温度提高到65℃也可以提高严格性。尽管这样改变可以使总的信号的信噪比增加，但也会导致某些特定信号的减弱。

1）配制杂交缓冲液：5×SSC，0.1%（w/v）SDS，5%（w/v）硫酸葡聚糖，20倍稀释的液体封阻剂（由荧光基因系统提供），100 μg/ml的变性非同源DNA（自由选择）。将所有的组分溶在一起并调整到所需的体积，边搅拌边稍加温有利于硫酸葡聚糖的彻底溶解（参见注释4）。

2）预热所需体积的杂交缓冲液（对于较小的膜杂交用0.3 ml/cm^{2}的杂交液，对于较大的膜杂交可减小比例至0.125 ml/cm^{2}或更少）至60℃，将膜放入60℃缓冲液中进行预杂交至少30 min，并均匀地轻轻振荡（参见注释5）。

3）将所需探针放入干净的小离心管中（参见注释6）。如果体积小于20 μl时可加入水或TE缓冲液使终体积达到此值。煮沸5 min使DNA变性后浸入冰水浴中速冷。

4）变性的探针稍事离心后加入到预杂交缓冲液中，不可直接加到膜上，轻轻地混匀（参见注释6）。在轻微振荡下60℃杂交过夜。

5）配制两种严格性洗涤溶液：一种是1×SSC，0.1%（w/v）SDS；另一种是0.5×SSC，0.1%（w/v）SDS。将两种溶液预热到60℃。小心地将膜转移至1×SSC，0.1%（w/v）SDS溶液中，60℃中轻轻振荡洗涤15 min。在60℃预热的0.5×SSC，0.1%（w/v）SDS溶液中再次洗涤15 min。在进行洗涤时洗涤液要过量（2～5 ml/cm^2）（参见注释7）。

3.3 封阻、抗体保温和洗涤

以下操作均在室温进行，并且所有的处理过程都须轻微振荡。

1）在杂交洗涤后用过量的（2 ml/cm^2）缓冲液A于室温淋洗膜（参见注释8）。

2）按大约0.75～1 ml/cm^{2}的比例在室温用10倍稀释的、以缓冲液A配制的封阻剂处理1 h（参见注释9）。

3）用缓冲液 A 按照第一步操作那样淋洗膜。

4）用新制备的、含有 0.5%（w/v）BSA 的缓冲液 A 将抗荧光素-碱性磷酸酯酶结合物作 5000 倍稀释，将膜置于稀释的混合物溶液中（0.3 ml/cm^2），于室温保温 1 h，并轻轻地振荡（参见注释 10）。

5）用稀释缓冲液配制的 0.3%（v/v）Tween－20 室温洗膜三次，每次 10 min，除去未与膜结合的抗体复合物，洗膜时要不断地振荡。洗涤液应过量（2～5 ml/cm^2）。

6）按照第一步操作用缓冲液 A 淋洗膜。

3.4 信号的产生和检测

在操作前应通读本节。如有条件，应戴上无粉手套，使用二氧杂环烷试剂时必须在通风橱中进行。

1）将荧光素基因标记系统所提供的检测袋剪开一边，大小以能覆盖住膜并在边上留出 1 cm 为度，另一边不剪开并将袋打开。

2）抗体结合物保温和洗涤步骤完成后，将膜的一角贴在干净的用于洗涤膜的盆或其他清洁物体表面，使过量的洗涤液沥干，然后将有样品的面向上放在打开的袋的一半处，切勿使膜干涸（参见注释 11）。

3）在通风橱中打开袋以暴露膜，用装有二氧杂环烷的喷雾瓶在膜的上方 2～3 cm 处喷洒液体。喷洒一次可以对付 14 cm^2，50 cm^2 的膜须喷 4 次。

4）喷洒试剂后将袋口折叠并立即将膜上的显色液抹匀。可以用 5 ml 的移管在表面滚动或用戴手套的手将表面的液体抹匀。

5）如要得到最佳结果，可将膜转移至干净的袋中并放在底片盒中（参见注释 12），应保证曝光之前袋的外部是干燥的。将装有膜的袋（有样品的面向上）放在底片盒中并置于暗室中。

6）关灯后取一张自显影底片放在膜上，关上盒子。对于目标 DNA 较多而不需高灵敏度的检测可曝光（自显影）1～2 h，对于需高灵敏度的检测则可曝光（自显影）4～16 h。取出底片后进行冲洗（参见注释 13）。

4. 注　　释

（1）如果待标记的 DNA 因过稀而不能直接使用时可采用乙醇沉淀法浓缩，然后再溶于合适体积的水或 TE 缓冲液中。如果用完整的质粒作为探针时务必按质粒序列在杂交中所占的比例校正杂交的条件。闭合环状双链 DNA 先切割成线状可以防止变性后过快的复性，但这一点通常并不必需。

（2）从低熔点胶中回收的 DNA 片段的体积多至 25 μl 时仍能用于标记反应中。反应的时间与温度可以根据方便与否自行选择，因为在反应的最后阶段会维持在一定水平上，在室温放置过夜并不会使产物显著减少。但是反应的速率在一定程度上依赖于 DNA 的纯度，因此对于低纯度的样品，例如小量制备的 DNA 或是从琼脂糖凝胶中回收的 DNA 可以延长反应时间。对于纯化的 DNA 样品，延长反应时间

(37℃，至 4 h）可以增加探针的产量。

(3) 合成的探针在变性后即可用于杂交，不必除去未掺入的核苷酸。如果希望长期保存探针则应置于暗处，因为荧光素分子对光是敏感的。

(4) 封阻液中核酸酶的活力已低至可以用于 Northern 印迹中。但是如果需要，仍可进行高压灭菌，但必须分装在可以高压灭菌的容器内。分装的杂交缓冲液在 -20℃ 至少可保存 12 个月。杂交液中加入经剪切并变性的非同源 DNA 能减少非特异性杂交，不过这样做时会使灵敏度有所降低。

(5) 杂交可以在含有探针的盒中、袋中或管中进行，只要有足够的缓冲液使探针易于与膜接触。如果膜比较大（$>50\ cm^2$）或是在袋中或管中用最小体积的杂交液杂交时，膜必须用 5×SSC 先行湿润。有时可以在同一杂交液中进行数张膜的杂交，但也必须用足够的体积，使缓冲液在膜上可以流通。一个袋中最多可以同时进行两张膜的杂交，当一个管中的杂交膜多于一张时，注意不能使膜相互重叠，如果杂交液过少或是膜不能够完全浸入溶液中时都会造成高背景。搅拌能增加杂交缓冲液与膜的接触，特别当溶液中同时进行多张膜的杂交时。

(6) 在目标 DNA 的量较少的情况下，推荐使用的探针浓度为 10～20 ng/ml（对于 50 ng 模板的反应来讲，这相当于每毫升杂交缓冲液中约有 1～2 μl 的反应产物）。目标 DNA 的量较多的情况下，推荐使用的探针浓度为 1～5 ng/ml。为了避免探针直接加到膜上，可取出一小部分杂交缓冲液先与探针混合，然后再加到其余杂交液中。对于 DNA 量较多的情况下杂交时间允许短一些，但有时会造成灵敏度降低，必要时可提高探针浓度进行补偿。

(7) 在进行第二次严格性洗涤时 SSC 的浓度可调节在 0.1×～1×之间以达到所需的严格程度[5]。也可以通过升高温度来调节洗涤的严格性。几张膜放在同一洗涤液中也能进行很好的洗涤，但它们必须能够自由活动。

(8) 高压灭菌的瓶一旦打开，未用完的缓冲液 A 应丢弃，这样可防止外源性碱性磷酸酯酶的污染。

(9) 稀释后的封阻液可冷冻贮存（分成小部分）几个星期，需用时化冻很容易，不过不能使用反复冻融的试剂。但为了便于工作，可将未稀释的封阻剂小份分装后冰冻。

(10) 稀释后的抗体结合物必须立即使用。稀释后的抗体结合物经贮存或经过冻融循环灵敏度要降低。几张膜可以同时保温，但要使膜能够充分接触到溶液。当处理大块膜时可以在杂交袋或管中进行，这样有利于减少使用的液体：20 cm×20 cm 的膜可以用 50 ml 的液体。操作中还可能发现抗体结合物的稀释可进一步优化：过大的稀释会导致信号强度的减弱，但同时也降低了背景；浓度过大时则会造成相反的结果。稀释缓冲液中必须用 BSA 组分 V（例如 Sigma 产品号 A-2153）。

(11) 杂交膜可以在通风橱中直接转移到检测袋中，如果正在实验桌上操作时可用塑料薄膜暂时盖在杂交膜上后拿进通风橱中。尽管用检测袋能得到最满意的结果，但可以用一张 Saran Wrap（Dow 化学公司）来代替检测袋。

(12) 加入检测试剂后将膜换入另一个袋可以避免将过多的液体带到曝光盒中。如果不换袋则应将过量的液体从袋中挤出，这样做也就可以达到要求了。如果使用 Saran

Wrap 膜必须保证液体不漏出。

（13）如果需要，可以在第一张底片曝光后对第二张底片进行适时的曝光。这个系统的高灵敏度可能在过夜曝光后造成过深的影像，可根据需要决定。第二天的光输出维持在比刚加入检测试剂后的几个小时内的光输出明显高得多的水平上，这时可以使用较短的最适曝光时间。一旦光输出稳定后，判断最适曝光时间还是比较容易的。

参 考 文 献

1. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132,** 6–13.
2. Reguero, M., Bernardi, F., Bottoni, A., Olivucci, M., and Robb, M. (1991) Chemiluminescent decomposition of 1,2-dioxetanes: an MC-SCF/MP2 study with VB analysis. *J. Am. Chem. Soc.* **113,** 1566–1571.
3. Schaap, A. P. (1988) Chemical and enzymatic triggering of 1,2-dioxetanes. *Photochem. Photobiol*. **47,** 50.
4. Schaap, A. P., Akhavan-Tafti, H., and Romano, L. J. (1989) Chemiluminescent substrates for alkaline phosphatase: application to ultrasensitive enzyme-linked immunoassays and DNA probes. *Clin. Chem.* **35,** 1863,1864.
5. Meinkoth, J. and Wahl, G. (1984) Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.* **138,** 267–284.

第九章　监测核酸探针中荧光素标记水平的快速检测

Martin Cunningham

1. 引　　言

无论是用随机引物法标记长探针（第八章）还是用3′末端法标记寡核苷酸（第十一章），荧光素-11-dUTP的掺入都可用下述的快速法进行检测。这里所介绍的基本步骤适用于随机引物标记的长探针，用于寡核苷酸标记物检测的改进方法则详述于注释中。如果样品需要鉴定，应该用铅笔在膜上做好记号，因为有些墨水会干扰测定。

2. 材　　料

1）20×SSC：3 mol/L NaCl，0.3 mol/L 柠檬酸钠。根据需要进行稀释。
2）10%（w/v）十二烷基硫酸钠（SDS）贮存液，根据需要进行稀释。
3）TE 缓冲液：10 mmol/L Tris、pH 8.0，1 mmol/L EDTA。
4）尼龙膜（例如 Hybond-N⁺，Amersham International，Amersham，UK）或 DE 81 纸（Whatman，Maidstone，UK）。
5）3 MM 滤纸（Whatman）。

3. 方　　法

1）将荧光素基因成像系统（fluorescein gene images system）中（详见第八章）的 5×核苷酸混合液用 TE 稀释成原浓度的 1/5、1/25、1/50、1/100、1/250、1/500、1/1000（参见注释 1）。
2）将 5 μl 标记的探针与 5 μl 1/5 稀释度的核苷酸混合物（阴性对照）点样在一条 Hybond-N⁺膜上，膜放置在一张不具吸收作用的衬垫上使液体吸收于膜中（但不能干），然后用过量的预热至 60℃的 2×SSC 在轻轻摇动的条件下洗涤 15 min（参见注释 2 和 3）。
3）制作参照试样条时用 5 μl 的除 1/5 稀释度外的其他稀释核苷酸混合物点样在另外一条 Hybond-N⁺膜上。参照试样条用 Saran Wrap™膜包裹后，于 -20℃中可在黑暗处保存几个星期以备再用。
4）将参照试样条与已经洗涤的样品条放在用 TE 略加湿润的 Whatman 3 MM 滤纸上，然后放入暗室（参见注释 4）。点样面向下置于透射紫外线灯下进行观察，使用 254 nm的短波透射进行紫外线灯检测时能得到最佳的对比度。在标记探针的点样位

置上可以见到荧光的斑点，荧光的强度应相当于参照条上稀释度 1/25 到 1/250 之间 (参见注释 5)。这样的结果表示荧光素已经成功地掺入到探针中去了。标记探针的荧光强度越是接近稀释得较少的参照（1/25 稀释度）时说明标记反应的效率越高。经洗涤的阴性对照参考条应只有极少量或根本没有荧光，这才说明探针的荧光是由于荧光素掺入所致，而并非未标记上的 Fl-UTP 所致。如果阴性对照上有明显的荧光，可以再次洗涤 15 min，这种情况只有在对照条没有干燥时才可能出现。

5）若需要永久性的硬拷贝时，可将膜照相。柯达 Wratten No.9 滤光镜（或类似的黄色滤光镜）应与 Polaroid 667 黑白胶卷联合使用。

4. 注　　释

(1) 使用 ECL 3′-寡核苷酸系统标记寡核苷酸探针时（参见第十一章），TE 稀释荧光素-11-dUTP（Fl-dUTP）的稀释度推荐用 1/16、1/100、1/250、1/500、1/1000，1/2000。

(2) 使用 3′-寡核苷酸标记系统时，每个标记探针的点样量为 5 μl，并点上 5 μl 1/16 稀释度的 Fl-dUTP 作为阴性对照。

(3) 除了 Hybond-N^{+} 外可使用 Whatman DE 81 纸，后者特别推荐用于寡核苷酸标记的检测反应中。在这种情况下必须用 2×SSC，0.1%（w/v）SDS 洗涤点样条。纸的周围要留出 1 cm 宽以防止洗涤过程中受到损坏。洗涤后再用水洗，并在进一步处理前再用乙醇进行淋洗（因为 DE 81 纸在水溶液中很脆）。

(4) 如果使用 DE 81 纸，参照条可依次用水与乙醇润湿一下（点上样品后），这样处理可以减少纸的变形，此外还必须使用干的 Whatman 3 MM 纸将样品转移到暗室中去。

(5) 高效的寡核苷酸标记应在 1/500 至 1/2000 稀释度之间可以看到荧光斑点。

第十章　辣根过氧化物酶标记的核酸探针制备及其强化的化学发光反应检测

Bronwen Harvey, Ian Durrant, Martin Cunningham

1. 引　　言

目前已有很多核酸标记与检测系统可供研究人员使用，其中不少在某些特定的应用方面具有特别的优点。通常将标记的方法分为两类：初级标记法，就是将可检测的信号，如同位素或荧光基团，直接标记到探针上去；另一类是酶标法，利用酶催化一个能产生信号的反应。在后一种方法中信号可以是荧光、有色化合物（生色基团）或是能产生光的化学发光反应。酶可以被直接偶联到探针上（直接标记法），也可以用一种抗体-酶或链霉抗生物素蛋白-酶复合物的方法引入到探针上，以便检测半抗原或生物素标记的探针（间接标记法）。间接标记的方法被广泛用于探针制备中，其中标记分子可以是荧光素、生物素或是地高辛。第八章叙述了这个系统中用荧光素标记探针的一个例子，标记的探针用荧光素抗体-碱性磷酸酯酶结合物进行检测，碱性磷酸酯酶（alkaline phosphatase，AP）又进一步催化高灵敏度的化学发光反应。

核酸探针的直接酶标法能更快地完成非放射性的检测，因为这里省略掉了与抗体有关的步骤。用辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）直接标记的方法是 Renz 和 Kurz[1]报道的。杂交后 HRP 用于催化一个强化的化学发光反应并且能很快地得到信号[2]。这个方法已被用于 ECL™直接标记系统（Amersham International，Amersham，UK），它为中等至高含量的目标 DNA 提供了一个方便而快速的非放射性标记检测方法。

标记步骤包括单链核酸探针与带正电荷的 HRP－p－苯醌-聚乙烯亚胺复合物的反应，后者作为标记反应试剂盒供应。它首先通过电荷的作用与带负电荷的核酸发生反应，随后加入的戊二醛又将复合物共价交联在核酸探针上。这个标记反应进行得很快，室温下 20 min 即能完成，并且对于探针的长度在 50 bp 至 50 kb 内都适用。标记后的探针可在 50%的甘油中于－20℃贮存几个月。变性的 DNA 或 RNA 探针都能用这个方法标记，并且标记量可以缩小至 100 ng 或放大至 1.5 μg。

在 60～70℃非变性条件下，杂交的最大速率出现在比探针的 T_m 值低 25℃时。由于 HRP 标记的探针对高温敏感，所以必须用 T_m 修饰剂，使杂交能在较低的温度下进行。本系统提供的金牌缓冲液（Gold buffer）中含有 6 mol/L 尿素，使杂交可以在 42℃进行[3,4]。这些条件等同于放射性标记的探针在 65℃杂交或是在 50%（v/v）甲酰胺存在的条件下于 42℃进行杂交。过氧化物酶在这些条件下至少稳定 24 h。金牌缓冲液中含有一种新的加速剂，它既能使信号达到最强又能使背景降低。在杂交与严格性洗涤的过程中通过对盐浓度的调节可以达到严格控制的目的。

由于酶是直接标记在探针上的，所以在杂交与严格性洗涤后不须进行费时的抗体封阻、保温、洗涤等操作。在严格性洗涤之后即可通过强化的化学发光反应进行检测，产生的光信号可以捕获在放射自显影底片上，形成硬拷贝。反应包括在过氧化物存在时过氧化物酶催化鲁米诺（环二烯肼）的氧化[5]。过氧化物以稳定的过酸盐（peracid）状态提供。该盐与强化剂/鲁米诺混合物在用前方能混合以避免逐渐发生化学降解。鲁米诺通过内过氧化物（endo-peroxide）转变成电子激活态的 3-氨基-邻苯二甲酸盐，当回到基态时便放出光。强化剂在酶、过氧化物与鲁米诺分子之间进行调节，使光辐射比未用强化剂时增加了约 1000 倍[2]。在这个反应中最大光输出的波长为 428 nm，大约相当于底片对于蓝光的灵敏度。

强化了的化学发光反应的光输出发生得很快，没有可察觉的延迟期，光输出的峰值在 5～10 min，之后以半衰期约为 1 h 的速度递减。衰减被认为是由于自由基所造成的酶活力的逐渐损失而导致。除了可以进行快速检测外，这些动力学特性对于再次探测也是有利的，因为酶在检测过程中已经失活，再次杂交与检测时不会出现最初探针杂交时所出现的条带，所以不用除去原来的探针就能在同一张膜上再次进行与新探针的杂交。

由于这个系统的快速标记，不用抗体封阻、保温、洗涤等和发光的快速动力学特性，使它适用于快速地进行高产量、大规模的筛选工作[6~8]。建立在过氧化物酶和强化的化学发光基础上的杂交通常只产生较低的背景，而且与碱性磷酸酯酶显色法相比，检测结果产生较少斑点，可是在碱性磷酸酯酶系统中则只要溶液不是非常清洁便会产生斑点。本系统还能得到高水平的信号。例如用浓度为 10 ng/ml 的探针进行过夜杂交能检测到低至 500 fg 的目标 DNA，相当于用 1 kb 的探针探测 1 μg 哺乳动物基因组样品中的单拷贝 DNA。当用于高含量的目标检测时，例如菌落或噬菌斑的筛选以及 PCR 产物的检测中，只须用 2 ng/ml 浓度的探针杂交 2 h 就能得到非常强的杂交信号，从而大大提高了检测的效率。

2. 材　　料

标记、杂交以及强化的化学发光检测的各种试剂均来自 ECL 直接标记检测试剂盒（RPN3000，RPN3001，RPN3005，Amersham International，plc）。每一试剂盒中都有详细说明，试剂盒在合适的条件下至少可稳定贮存 3 个月。但是标记试剂对光敏感，保存时应避免强光照射或长时间暴露于光线中。这些试剂以及实验中用到的其他溶液与试剂罗列于下。

2.1 探针标记

1）标记试剂：包括与聚乙烯亚胺（PEI）交联的辣根过氧化物酶，它的合成方法详见参考文献[1]，也可以购买成品（Amersham）。使用方法见下文。
2）戊二醛溶液（1.5%的水溶液）：1.5%（v/v）的戊二醛溶于去离子水中。尽管戊二醛是一种有害的试剂，但在 ECL 系统中所用仅为 1.5%（v/v），在这样的低浓度下可以不列入有害物一类，不过仍须像其他一切化学药品那样按照规范的实验室操作

使用。

2.2 杂　交

1）金牌杂交缓冲液：可以购得缓冲液成品（Amersham）。缓冲液中除了 6 mol/L 尿素外还含有去污剂、pH 稳定剂与新型的加速系统。与早期的 ECL 直接检测系统相比，新的加速剂还直接使检测灵敏度显著提高。新的杂交缓冲液保证了较高水平的目标 DNA 检测，并在杂交过程中增强酶标的稳定性。
2）封阻剂。
3）氯化钠（分析纯）。

2.3 严格性洗涤

1）20×SSC：0.3 mol/L 柠檬酸三钠，3.0 mol/L 氯化钠、pH 7.0。
2）含尿素的初级洗涤缓冲液：360 g 尿素，4 g 十二烷基硫酸钠（SDS），25 ml 20×SSC，定容至 1 L。
3）不含尿素的初级洗涤缓冲液：4 g SDS，25 ml 20×SSC，定容至 1 L。
4）次级洗涤缓冲液：2×SSC。

2.4 检　测

1）ECL 检测试剂Ⅰ：硼酸缓冲液中含有特别纯化过的鲁米诺和 ECL 促进剂。
2）ECL 检测试剂Ⅱ：硼酸缓冲液中含有过酸盐。
3）Saran Wrap™（Dow 化学公司）膜：推荐用于本操作的各个步骤中，特别适用于分子生物学各方面的应用中，因为此膜不吸收紫外线或蓝色光线。Saran Wrap 可以从当地供应商处购得。
4）蓝光敏感的放射自显影底片是最适用于 ECL 系统的底片（Hyperfilm ECL，Amersham），但是也可用其他 X 射线底片，例如 Hyperfilm-MP，Kodak-AR。膜上的发光也可以用具备电荷偶联装置的相机进行检测。

3. 方　法

3.1 探针标记

1）在 1.5 ml 微型离心管中将待标记的核酸稀释成 10 ng/μl 的浓度（参见注释 1），盖上盖子后将管子置于沸水中 5 min 使核酸变性（参见注释 2 和 3）。
2）将管子取出立即置于冰浴中 5 min，然后稍事离心（10 s）使液体集中在管底部。
3）管中加入与样品等体积的标记试剂，用微量移液器吸放液体借以混匀，注意吸放液体时须缓慢地进行操作（参见注释 4）。

4）加入与标记试剂等体积的戊二醛溶液，再次用移液器缓慢地混匀。

5）37℃保温 10 min。这时探针已被 HRP 标记上，如不立即使用可于冰上保存长达 15 min（参见注释 5）。

3.2 杂　交

1）杂交液的配制如下：取出所需体积的金牌杂交缓冲液并加入固体氯化钠至终浓度为 0.5 mol/L（参见注释 6）。尽管 0.5 mol/L 的 NaCl 对于大多数标记反应都可以得到满意的效果，但它的浓度仍可随标记探针的不同而改变。加入封阻试剂至终浓度为 5%（w/v）。快速将封阻试剂与缓冲液混合以避免生成凝块。用磁力搅拌器在 42℃ 继续搅拌混合 30～60 min，封阻试剂中少量未溶解的颗粒不会影响杂交效果。

2）将有目标 DNA 的膜放在准备好的 42℃ 预热杂交液的表面（参见注释 7）。杂交缓冲液与膜的比例为 0.25 ml/cm^2 时大多数杂交都能得到满意的结果。（参见注释 8 和 9）。在膜浸入杂交缓冲液前先使其充分湿润，预杂交在 42℃ 水浴中进行，缓慢地摇动 15～60 min。

3）按照实验需要（参见注释 10）在预杂交液中加入终浓度为 10 ng/ml 或是 2～5 ng/ml 的探针（3.1 节第 5 步中标记的探针），并且缓慢地混匀，注意切勿将探针直接加到膜上。继续于 42℃ 缓慢摇动 2 h 至过夜。

3.3 严格性洗涤

1）将足量的初级洗涤缓冲液预热至 42℃，以 2 ml/cm^2 的缓冲液洗涤两次（参见注释 11）。

2）小心地将膜从杂交容器中转移到干净容器中，其中装有半量的预热的初级洗涤缓冲液。在 42℃ 水浴中振荡 20 min 后倒去洗涤液，换上剩下的缓冲液，在缓慢的摇动下于 42℃ 再振荡保温 20 min。

3）倒去洗涤液，将膜放在干净的容器中，加入过量的次级洗涤缓冲液（至少 2 ml/cm^2）。室温下缓慢地摇动 5 min，倒出液体后换上新的次级洗涤缓冲液，重复这步操作（参见注释 12）。必要时膜可于此步操作后暂时保存（参见注释 13）。

3.4 检　测

1）混合等体积的检测试剂Ⅰ与试剂Ⅱ，配制按照 0.125 ml/cm^2 比例的足够量的混合液（参见注释 14）。

2）用镊子小心地将膜从最后一次的次级洗涤液中取出，将膜的底边靠在纸巾上吸去过多的液体。膜正面向上放在置于工作台上的 Saran Wrap 膜上。

3）将新配制的检测混合试剂均匀地覆盖于膜上，放置 1 min。从这步起进行得越快越好，使尽量缩短从加入底物起至底片曝光这段时间。

4）用镊子取出膜，将底边靠在纸巾上吸去过多的检测剂。将杂交膜正面向下放在底片

盒中的 Saran Wrap 膜上。

5）用 Saran Wrap 膜将杂交膜完全裹住，但要保证膜的正面只覆盖一层 Saran Wrap。将膜倒转使样品面向上。

6）在暗室的红光中将一张对蓝光敏感的底片放在膜上，盖上盒盖后在室温“曝光”适当的时间（参见注释 15）。按常规方法冲洗底片。

4．注　　释

（1）每个管中可标记核酸 10 μl（100 ng）至 150 μl（1.5 μg），当管中核酸的体积超过 150 μl 时标记效率就会下降。

（2）标记双链探针时必须完全变性方能得到最大标记效率。在使用电热板进行操作时应考虑延长时间，这是因为电热板的变性效果不如沸水浴。变性步骤对于单链探针并不必须，但为了防止 RNA 形成二级结构，变性步骤也仍然是可取的。

（3）因为标记反应部分地通过带负电荷的核酸与带正荷的标记试剂之间的离子作用来完成的，所以样品中的盐浓度不能超过 10 mmol/L。

（4）若要得到最大标记效率，使用等体积的核酸与标记试剂是很重要的。精确估计探针的浓度（10 ng/μl）对于达到最大检测灵敏度是必要的。

（5）探针一旦被标记上就成为单链，能用于任何形式的膜杂交中。如果期望贮存的时间超过 15 min 就应加入灭菌甘油使甘油终浓度达到 50%，并于 −20℃ 保存。这种条件下探针可保存 12 个月，在这期间内用于杂交没有明显的灵敏度损失。

（6）尽管在某些情况下由于严格性的要求须要对 NaCl 的浓度进行调整，但 0.5 mol/L 的 NaCl 还是适用于各类探针。

（7）当膜的面积大于 100 cm^2 时，在加入杂交液前须先用 5×SSC 润湿膜。使用带电荷的尼龙膜例如 Hybond-N^+（Amersham International）能达到最高的检测灵敏度，但是大多数情况下使用不带电荷的尼龙膜（例如 Hybond-N）或硝酸纤维素膜（例如 Hybond-ECL）也能得到满意的结果。

（8）如果杂交在盒中进行，应使用 0.25 ml/cm^2 的缓冲液，当盒的面积明显大于膜时，杂交液的体积应与盒底的面积相当。如果盒中的缓冲液足够并且膜能自由活动，也可数张膜同时进行杂交，否则易导致高背景。

（9）杂交可在袋中或杂交管中进行。在这种情况下 0.125 ml/cm^2 的缓冲液就已足够。使用杂交管时特别重要的一点是须将杂交管与膜之间的气泡排除干净，因为气泡会在检测后造成膜上斑片状高背景。如果膜有显著的重叠现象时可使用尼龙网，以保证膜能很好地与探针接触。

（10）探针的终浓度为 10 ng/ml 并且杂交过夜时检测灵敏度最高，足以在 Southern 印迹中检测哺乳动物基因组中的单拷贝基因，但是对于诸如菌落、噬菌斑以及细菌基因或 PCR 产物等的检测只需低灵敏度，使用浓度为 2～5 ng/ml 的探针与 2 h 的杂交条件就已经足够了。

（11）严格性可以通过调节初级洗涤时 SSC 的浓度来控制。初级洗涤时所用 SSC 的浓度为 5×SSC。但是使用低浓度的 SSC，例如 0.1×SSC 时严格性更高，从而可获得

更加特异性的杂交信号。通常这样的洗涤液中含有 6 mol/L 尿素，在 42℃ 进行。但是用不含尿素的初级洗涤液，在 55℃ 进行洗涤也能得到同样的效果。在这样的情况下总的洗涤时间应限于 20 min 内完成，以保留过氧化物酶的活力。

(12) 次级洗涤应保证将 SDS 洗净，因为 SDS 对强化的化学发光反应可能有干扰。

(13) 杂交膜用次级洗涤液润湿并用 Saran Wrap 包裹后可于 4℃ 中保存 24 h。经保存的膜在检测前应用新鲜的次级洗涤液稍加淋洗。

(14) 检测试剂最好分开保存，于临用前混合，这样可以避免底物发生缓慢的分解。但是如果配好后并不立即使用则应置于冰浴中，最多也只能放置 30 min。

(15) 在开始时的几次实验中，对于较少的目标 DNA 的检测反应推荐曝光 30～60 min。另一种办法是先进行 1～2 min 的短暂曝光，用此作为参照以估计以后的曝光时间。在菌落与噬菌斑的筛选中，非常重要的一点是曝光的时间应尽可能地短，因为在这种情况下阳性的菌落或噬菌斑可以清楚地被分辨出来，从而避免假阳性的结果。

参 考 文 献

1. Renz, M. and Kurz, C. (1984) A colorimetric method for DNA hybridization. *Nucleic Acids Res.* **12,** 3435–3444.
2. Whitehead, T. P., Thorpe, G. H. G., Carter, T. J. N., Groucutt, C., and Kricka, L. J. (1983) Enhanced chemiluminescence procedure for sensitive determination of peroxidase-labelled conjugates in immunoassay. *Nature* **305,** 158,159.
3. Hutton, J. R. (1977) Renaturation kinetics and thermal stability of DNA in aqueous solutions of formamide and urea. *Nucleic Acids Res.* **4,** 3537–3555.
4. Stone, T. (1992) ECL direct system: an analysis of filter hybridization kinetics. *Life Sci. (Amersham International)* **7,** 8–10.
5. Roswell, D. F. and White, E. H. (1978) The chemiluminescence of luminol and related hydrazides. *Methods Enzymol.* **57,** 409–423.
6. Durrant, I., Benge, L. A. C., Sturrock, C., Devenish, A. T., Howe, R., Roe, S., Moore, M., Scozzafava, G., Proudfoot, L. M. F., Richardson, T. C., and McFarthing, K. G. (1990) The application of enhanced chemiluminescence to membrane-based nucleic acid detection. *Biotechniques* **8,** 564–570.
7. Cohn, D., Chumakov, I., and Weissenbach, J. (1993) A first-generation physical map of the human genome. *Nature* **366,** 698–701.
8. Sorg, R., Enczmann, J., Sorg, U., Kogler, G., Schneider, E. M., and Wermet, I. (1990) Specific non-radioactive detection of PCR-amplified sequences with enhanced chemiluminescence labeling. *Life Sci.* **2,** 3,4.

第十一章　寡核苷酸 3′端的荧光素-11－dUTP 标记及其强化的化学发光反应检测

Martin Cunningham，Ian Durrant，Bronwen Harvey

1. 引　　言

本章标题中的反应包括用末端转移酶将荧光素核苷酸短尾引入到寡核苷酸的 3′端[1]，以及随后用辣根过氧化物酶催化的强化的化学发光法检测标记的杂交产物。本方法用 ECL 3′-末端寡核苷酸的标记与检测系统（Amersham Internatinal，Amersham，UK）作膜上杂交。通常寡核苷酸探针用于较低灵敏度的检测应用中，但是当与荧光素标记以及强化的化学荧光法联合应用时，曝光时间在 1 h 以内可以检测到低至 20×10^{-18} mol 的同源序列。

2. 材　　料

标记与强化的化学荧光检测所需试剂可用 ECL 3′端寡核苷酸标记与检测系统试剂盒（Amersham International，plc）。这些组分以及其他溶液和试剂的配制见下文。

2.1　寡核苷酸标记

1）荧光素-11－dUTP：这一核苷酸由 ECL 3′端寡核苷酸标记与检测系统试剂盒提供。
2）末端转移酶：由上述系统提供 2 U/μl 的末端转移酶。
3）二甲胂酸盐缓冲液：该系统提供 10×的浓缩缓冲液、pH 7.2。注意二甲胂酸盐是剧毒的化合物，使用时须遵守安全规定。
4）TE 缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，1 mmol/L EDTA。

2.2　杂　　交

1）液体封阻剂：由 ECL 3′端寡核苷酸标记和检测系统提供，用于杂交缓冲液中以及膜封阻溶液中。
2）杂交缓冲液：由上述系统提供，在杂交中可得到最大的信噪比。
3）20%（w/v）SDS 贮存液。
4）20×SSC：0.3 mol/L 柠檬酸钠，3 mol/L NaCl。

2.3 膜的洗涤

1）20%（w/ v）SDS贮存液
2）20×SSC：0.3 mol/L 柠檬酸钠，3 mol/L NaCl。

2.4 膜的封阻，抗体的保温与洗涤

1）抗荧光素-HRP 结合物：ECL 3′-寡核苷酸标记和检测系统提供 1000×的贮存液。抗体结合物经制备并调节到使在膜杂交中出现本底很低的背景。
2）缓冲液Ⅰ：0.15 mol/L NaCl，0.1 mol/L Tris、pH 7.5。
3）缓冲液Ⅱ：0.4 mol/L NaCl，0.1 mol/L Tris、pH 7.5。
4）牛血清白蛋白（BSA）组分 V：例如 Sigma（St. Louis，MO）产品号 A-2153。

2.5 信号的产生与检测

1）ECL 检测试剂Ⅰ：硼酸缓冲液中含有特别纯化过的鲁米诺与 ECL 强化剂。
2）ECL 检测试剂Ⅱ：硼酸缓冲液中含有过酸盐。
3）Saran Wrap™（Dow 化学公司）：用于不同的操作阶段，不吸收紫外线或蓝色光线。
4）蓝光敏感的放射自显影底片：合适的底片由厂商供应（Hyperfilm™-ECL，Amersham），但是其他 X 射线底片也可以用，例如 Hyperfilm-MP，Kodak-AR。光输出也可以用电荷耦合装置的摄影机检测。

3. 方　　法

3.1 寡核苷酸标记

本方法可以标记带有 3′-OH 的寡核苷酸单链。
1）将除酶以外的所须标记试剂的各种组分放在冰浴中解冻（参见注释 1）。
2）置于冰浴中的 1.5 ml 聚丙烯离心管中依次加入下列标记反应的各种组分：100 pmol 寡核苷酸，10 μl 荧光素-11-dUTP，16 μl 二甲胂酸盐缓冲液，加水至 144 μl。然后加入 16 μl 的末端转移酶，使终体积达到 160 μl（参见注释 2）。
3）用微量移液器的尖端缓慢地吸放样品，混匀溶液中的各个组分。
4）反应混合物于 37℃ 保温 60～90 min。
5）如果需要，可用快速标记检测法（参见第九章）检查标记效果。
6）对于立即使用的探针可放在冰上暂时保存，如果需长时间保存可于 -20℃ 暗中放置（参见注释 3）。

3.2 杂　交

杂交温度是由所使用探针的序列所决定的。理想情况下杂交的严格性可由杂交后的洗涤条件控制，对于大多数系统可以使用 42℃ 的杂交温度。通常杂交温度必须比寡核苷酸探针的解链温度（T_m）低 5～10℃[2]（寡核苷酸的 3′尾的存在并不显著影响 T_m 值)。

1）推荐使用的杂交缓冲液中含有下列组分：5×SSC，0.1%（w/v）的杂交缓冲液组分，0.02%（w/v）的 SDS 以及 20 倍稀释的液体封阻试剂。将所有组分加入后调整到所需要的体积，搅拌混匀（参见注释 4 和 5)。
2）将膜放在杂交缓冲液中，于水浴中振荡进行预杂交至少 30 min。
3）预杂交后在缓冲液中加入终浓度为 5～10 ng/ml 的标记的寡核苷酸探针（参见注释 6)。
4）在振荡水浴中于合适的温度下杂交 1～2 h（参见注释 7)。

3.3 膜的洗涤

杂交的严格性可以通过洗涤步骤来控制。3′端的加尾并不改变未标记顺序所需的洗涤严格性。严格性可以通过改变洗涤过程中的温度与 SSC 的浓度来控制（参见注释 8)。

1）从杂交缓冲液中取出膜置于干净的容器中，加入过量的 5×SSC，0.1%（w/v）SDS，覆盖过膜。用量相当于 2 ml/cm^2。膜必须能在溶液中自由移动。
2）室温下经常摇动保温 5 min。
3）倒出洗涤液后加入新的 5×SSC，0.1%（w/v）SDS，再次保温 5 min。
4）倒去洗涤液。取出膜放在干净的容器中，倒入经过预热的合适的严格性洗涤缓冲液，体积以能盖过膜并且稍稍过量为度。含有 1×SSC、0.1%（w/v）SDS 的洗涤液对于大多数系统是合适的。
5）在所需的温度下（通常 42～50℃），在振荡水浴中保温 15 min。
6）倒出严格性洗涤缓冲液后再次倒入新的洗涤液（同第 4 步）并在第 5 步所用温度下放置 15 min。

3.4 膜的封阻、抗体保温与洗涤

下列操作均在室温进行，并且膜的所有处理过程均须经常振荡。

1）将膜放在一个干净的容器中，用缓冲液 I 淋洗 1 min，缓冲液的用量为 2 ml/cm^2。
2）倒出缓冲液 I，并按 0.25 ml/cm^2 的用量换入封阻液（用缓冲液 I 将液体封阻剂稀释 20 倍)，至少保温 30 min。
3）用缓冲液 I 以 2 ml/cm^2 膜的用量淋洗膜 1 min。
4）用含有 0.5%（w/v）BSA（组分 V）的缓冲液 II 将抗荧光素-HRP 结合物稀释 1000 倍。配制的量必须相当于 0.25 ml/cm^2。

5）将膜放在稀释的抗体结合物溶液中保温 30 min。
6）将膜放在干净的容器中，用过量的缓冲液Ⅱ淋洗膜 5 min，所用体积与第 1 步相同。
7）如同第 6 步重复洗涤三次，以保证彻底洗去非特异性结合的抗体（参见注释 9）。

3.5 信号的产生与检测

本节按照 ECL 直接检测法进行操作（参见第十章）。曝光时间随靶物质的量而不同，标记 DNA 的量较大时，典型的曝光时间为 1～10 min，标记 DNA 的量较少时，曝光时间为 10～60 min。对于目标 DNA 的量较大的系统还可以进行多次曝光。

4. 注　　释

(1) 临用前迅速将末端转移酶取出置于冰上，取出所需的部分后原管应尽快放回 -20℃冰箱中。
(2) 待标记的寡聚核苷酸最好溶于灭菌蒸馏水中。根据 DNA 序列的长度不同 100 pmol 寡聚核苷酸的质量也不同：

碱基数	质量（ng）
15	500
20	660
30	1000
50	1660

如果待标记的探针量与上列的不同，反应物的体积与反应终体积都要根据探针 DNA 的用量进行相同比例的调整。25～250 pmol 之间的探针都能成功地进行标记。
(3) 标记后的探针并不必须纯化。
(4) 为了实验方便建议多配一些杂交缓冲液，然后分装保存于 -20℃。在这种情况下杂交缓冲液至少稳定 3 个月。
(5) 杂交缓冲液与膜的比例必须是 0.25 ml/cm^2，若大片膜在塑料袋中进行杂交或在炉中进行杂交时此比例可以降低至 0.125 ml/cm^2。当杂交容器的大小不同或杂交膜的张数不同时也应调整缓冲液的用量，但必须使膜在杂交液中能够自由活动。
(6) 杂交开始时要避免将探针直接加到膜上。可以先用少量的缓冲液将探针稀释，然后再加入到大量的杂交缓冲液混合。
(7) 杂交时间可增加到 17 h，检测灵敏度没有明显的改变。
(8) 如果室温贮存的严格性洗涤液有任何沉淀时应在使用前稍加热，直至沉淀溶解。洗涤液中的 SSC 的浓度可以在 0.1～1×SSC 之间调节以达到所需的洗涤严格性，而 SDS 的浓度则应保持在 0.1%（w/v）。在低于探针 T_m 值 3～5℃时，上述的洗涤条件下可以从错配的 DNA 序列中区别出完全配对的序列来[2]。严格的洗涤温度可高达 65℃，但是如果同时改变 SSC 浓度便不一定要超过 50℃就能达到所需的严格性。

(9) 可以在检测反应前将膜贮存于最后一步洗涤液中达 30 min，如需更长时间保存则要将膜取出，包在 Saran Wrap 膜中置于 2～8℃冰箱中贮存，注意不能让膜干涸。

参 考 文 献

1. Bollum, F. J. (1974) Terminal deoxynucleotidyl transferase, in *The Enzymes*, vol. 10 (Boyer, P. D., ed.), Academic, New York, pp. 145–171.
2. Wallace, R. B. and Miyada, C. G. (1990) Oligonucleotide probes for the screening of recombinant DNA libraries. *Methods Enzymol* **152,** 432–442.

第十二章　RNA 探针的制备

Dominique Belin

1. 引　　言

从沙门氏菌噬菌体 SP6 和大肠杆菌噬菌体 T7、T3 中分离并鉴定出 RNA 聚合酶的成就革新了 RNA 代谢研究的各个方面[1~6]。事实上现在已经能够生产出化学纯的、不论多大量的任何 RNA 分子，这项技术是建立在病毒转录单位的种种性质的基础上的。首先，不同于细胞中 RNA 聚合酶，噬菌体的酶是单链的蛋白，容易从被噬菌体感染的细菌中分离出来，并且现在已经能用 DNA 重组技术制造。其次，它们能非常特异性地识别自己的启动子，这些启动子是由 17～20 个连续碱基所组成，很少出现在细菌质粒

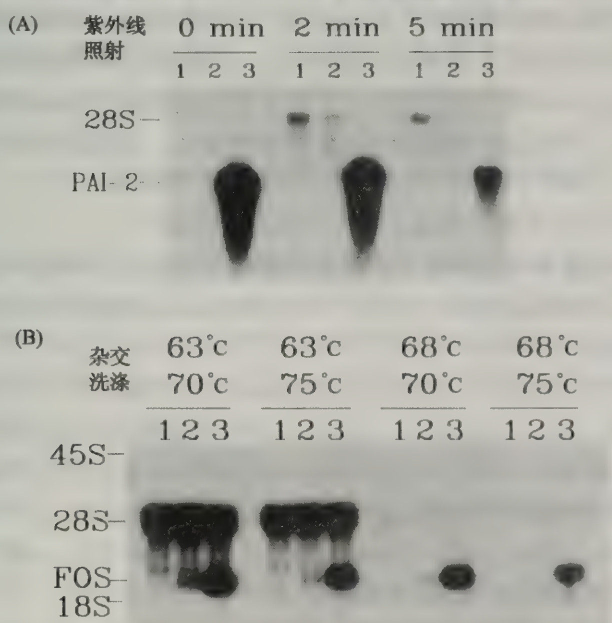


图 12.1 (A) 紫外线照射交联效果。小鼠细胞全部 RNA 中的 PAI-2 mRNA 与同源 cRNA 探针的 Northern 印迹杂交。第一与第二泳道分别为妊娠 15.5 d 与 18.5 d 的 5 μg 胎盘 RNA，其中不含有可检测量的 PAI-2 mRNA；第三泳道为 1 μg 经 LPS 诱导的巨噬细胞 RNA，它是 PAI-2 mRNA 的丰富来源[15]。所有的样品同时电泳与转移。膜经切割后，每一张膜都用紫外线照射，时间如图上所示。所有的膜同时置于 58℃ 进行杂交，70℃ 洗涤并且同时曝光。经紫外线照射后探针与 28S rRNA 的杂交更为明显，特异性的杂交在紫外线照射 5 min 后减少。(B) 杂交温度效应。大鼠细胞全部 RNA 中的 *c-fos* mRNA 与小鼠的 *v-fos* cRNA 探针的 Northern 印迹杂交。第一泳道为未诱导的细胞；第二泳道为部分诱导的细胞；第三泳道为充分诱导的细胞（M.Prentki 和 D.B.，未发表）。所有样品同时电泳与转移，未用紫外线照射交联的膜在标明的温度进行平行的杂交与洗涤，四张膜同时曝光。探针对 28S rRNA 的交叉杂交在 68℃ 杂交时基本上已消除。在 75℃ 的严格性洗涤中有些特异性的信号消失。

或真核生物的 DNA 中。第三，该酶具有高度的持续性，能有效地从 DNA 模板上合成长串的转录物。本章将讨论 DNA 模板的制备以及从模板上合成^{32}P标记的 RNA 分子的转录过程。这种标记的 RNA 通常称为 RNA 探针（riboprobe）。

使用 RNA 探针的原理与 DNA 探针相同，可用于 Southern 或 Northern 杂交中。RNA 探针能避免双链 DNA 探针所产生的自我复性的问题，自我复性导致与膜上固定的目标 DNA 杂交的探针的减少，特别是当探针与目标 DNA 的同源程度不高时，再一次复性的探针可能取代不完全配对的杂交物。使用单链的 RNA 探针时不会发生自身复性的现象，但是遇到最困难的问题是由于 RNA:RNA 更为热稳定。于是富含 GC 的探针与 rRNAs 之间的交叉杂交将造成不能接受的高本底。这个问题经常用提高杂交条件的严格性来解决，如图 12.1 中所示。此外也可以将模板中富含 GC 的区段除去。

2. 材　　料

进行亚克隆、聚合酶链式反应（PCR）和凝胶电泳时所需的材料也和下面列出的一样，都须用标准的分子生物学材料与方法。操作 RNA 时比操作 DNA 时更要小心，因为消除 RNase 的污染是非常重要的。RNase 有两个主要来源：实验者的皮肤和溶液中的微生物污染。大多数 RNase 不需要二价阳离子，并且高压灭菌也不能使它不可逆地变性。实验时必须戴上手套并且经常更换。尽管某些机械制造的管子与吸管头未经灭菌也能取得实验的成功，但还是必须使用经灭菌的塑料制品，玻璃器皿必须放在 180℃ 干热烘烤数小时。

限制酶切割与 PCR 扩增分别载于第二与第三十四章中。

1）水：尽管不少实验书中推荐用二乙基焦碳酸盐处理的水来配制所有溶液，但笔者却认为并无必要。耐高压灭菌（121℃，15～30 min）的母液可用双蒸水配制，否则应用灭菌水配制。

2）TE：10 mmol/L Tris-HCl 、pH 8.1，1 mmol/L EDTA。

3）10 × TB：0.4 mol/L Tris-HCl 、pH 7.4，0.2 mol/L NaCl，60 mmol/L $MgCl_2$，20 mmol/L 亚精胺。当所使用的每种核糖核苷酸的浓度大于 0.5 mmol/L 时，就应该增加 $MgCl_2$ 的浓度以使游离 Mg^{2+} 的浓度达到 4 mmol/L。

4）0.2 mol/L DTT：溶液分小份贮存于 −20℃，每管只能使用一次。溶液中可以加入 0.5 mmol/L 的 EDTA 以稳定 DTT 溶液。

5）核糖核苷酸溶液：中和的核苷酸溶液有成品供应，也可以用干粉配制（参见注释 1）。核糖核苷酸溶液可于 −20℃ 贮存数月。

6）BSA：2 mg/ml 的牛血清白蛋白，贮存于 −20℃。

7）RNase 抑制剂：U/μl 的胎盘 RNase 抑制剂，贮存于 −20℃。

8）RNA 聚合酶贮存液：T3、T7 与 SP6 三种 RNA 聚合酶有商品供应。贮存于 −20℃。

9）RNA 聚合酶稀释缓冲液：50 mmol/L Tris-HCl、pH 8.1，1 mmol/L DTT，0.1 mmol/L EDTA，500 μg/ml BSA，5% 甘油。稀释后的酶不稳定，在冰浴中贮存不可超过几小时。

10）无 RNase 的 DNase。

11）终止液：1%SDS，10 mmol/L EDTA，1 mg/ml tRNA。tRNA 可省去。

12）TEN：10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.1，1 mmol/L EDTA 和 100 mmol/L NaCl。

3. 方　　法

3.1 线性化的质粒模板供进行到底的转录

1）将所需的基因片段亚克隆到合适的转录载体上（参见注释 2）。

2）用碱裂解法从 30～100 ml 生长达到饱和的培养物中分离质粒 DNA。用 CsCl/溴化乙锭超离心法或用聚乙二醇沉淀法纯化质粒 DNA（参见注释 3）。

3）选用合适的限制酶消化 2～20 μg 的质粒 DNA 使成线形（参见注释 4）。取一小部分（0.2～0.5 μg）DNA 在含有溴化乙锭（0.5 μg/ml）的琼脂糖微型胶上电泳以检查酶切程度（参见注释 5）。

4）用酚/氯仿抽提经酶切的 DNA 两次，然后用氯仿抽提一次除去残留的酚。用乙醇沉淀 DNA。如果只有少量 DNA（少于 5 μg），可以加入 10 μg 的糖原作为载体，这种载体对转录不会造成不利影响。用乙醇洗涤沉淀后空气干燥，然后悬浮于 TE 中，使浓度为 1 μg/μl。

3.2 合成的模板和从 PCR 法制备的模板

用限制性内切酶克隆插入片段和使质粒模板线性化的最大限制因素是不一定常有合适的酶切位点。此外，转录物总是含有与内源性 RNA 不同的 5′端或 3′端的部分。解决这些问题的一个方法是用合成的寡聚脱氧核苷酸复性所形成的 DNA 小片段来转录[6,7]。另外一个更为常用的方法是通过 PCR 法扩增质粒所产生的模板来转录。从理论上来说这些模板可以指导任何 RNA 序列的合成。

1）具有一个复合序列的 5′端引物的设计：5′端是由小的 T7 启动子组成，3′端相当于转录物的起始部分（参见注释 6）。通常 6～10 个核苷酸已经足够在质粒模板上启动 DNA 的合成。

2）3′端引物的设计：通常是 17～20 个核苷酸的长度，并能确定转录物的 3′端（参见注释 7）。

3）用 PCR 法扩增总体积为 100 μl 中的 2～50 ng 的质粒 DNA。验证所需大小的 DNA 片段是否已被扩增，并与已知标准比较以估计 DNA 的量。

4）按照 3.1 节第 4 步的方法纯化 DNA 并以合适的浓度悬浮于 TE。用 PCR 法扩增的模板进行转录时的浓度比质粒模板为低，以维持酶与启动子之间的摩尔比。对于 100 bp长度的片段笔者使用的浓度为 3 μg/ml。

3.3 放射性探针的基本转录步骤

1）在总体积为 20 μl 的转录混合物中依次加入下列组分：水（所需的体积），2 μl 10×TB，1 μl BSA，1 μl 0.2 mol/L DTT，0.5 μl RNase 抑制剂，2 μl 5 mmol/L 的三种核苷酸（即 ATP，GTP，CTP），10 μl α[^{32}P]-UTP（400 Ci/ mmol/L，10 mCi/ml），1 μl 限制酶消化过的质粒 DNA 模板以及 0.25～0.75 μl 的 RNA 聚合酶（参见注释 8 与 9）。

2）T3 与 T7 RNA 聚合酶需 37℃保温 40 min，SP6 RNA 聚合酶需 40℃保温 40 min。在加入相同单位的酶后（参见注释 9）继续保温 40 min。

3）用不含 RNase 的 DNase（1 U/ng DNA）在 37℃降解模板 DNA 20 min，然后加入 40 μl 终止液终止反应。

4）用酚/氯仿抽提二次，有机相用 50 μl TEN 回抽一次，合并水相抽提物后用离心过柱法去除未掺入的核苷酸。离心柱通过下列方法制备：用 TEN 配制成 50％的糊状的 G-50 Sephadex（Pharmacia），灭菌后装入一次性柱（QS-Q，Isolab）中，然后以 200 *g* 离心 5 min。小心将样品放在干树脂的上面，然后将柱放在灭过菌的锥形离心管内。以 200 *g* 离心 5 min 后将 200 μl TEN 置于树脂上面并继续离心。洗脱的 RNA 溶液大约有 200～400 μl，用乙醇沉淀后悬于水中（参见注释 10）。

5）取出部分溶液用计数器测定掺入效率（参见注释 11）。转录产物的大小可以通过聚丙烯酰胺/尿素凝胶电泳来鉴定（见第四十七章与注释 12）。

4. 注　　释

（1）粉末状的核糖核苷酸必须先悬浮于水中，用 1 mol/L NaOH 或 HCl 将溶液的 pH 值调整到 6～8，然后通过测定紫外线吸收再调节至所需要的浓度。

100 mmol/L 的 ATP：259 nm 时吸收单位为 1540，
100 mmol/L 的 GTP：253 nm 时吸收单位为 1370，
100 mmol/L 的 CTP：271 nm 时吸收单位为 910，
100 mmol/L 的 UTP：262 nm 时吸收单位为 1000。

核糖核苷酸溶液的完整性可以通过 PEI-纤维素（PEI-CEL 300）薄层层析来鉴定。树脂先通过上行层析用水洗涤以除去原来残留的紫外线吸收物质，然后晾干。在树脂上加样 10～30 nmol 的核糖核苷酸，通过上行层析使核苷酸分开。用于层析的 0.5 mol/L KH_2PO_4 以 H_3PO_4 调节 pH 值至 3.5。干后用 254 nm 的紫外线检测核糖核苷酸。

（2）可以购买到的载体都是从大肠杆菌质粒 ColE1 衍生的高拷贝质粒。最初的质粒（pSP64 和 pSP65，Promega）只是在多克隆位点（multiple cloning sites，MCS）的上游含有惟一的 SP6 启动子[2]；第二代质粒在多克隆位点的两端各有一个方向相反的启动子，使无论哪头插入的 DNA 片段都能进行转录。pGEM 系列（Promega）含有 SP6 与 T7 启动子[5]，pBluescript™ 系列（Stratagene，La Jolla，

CA）则含有 T7 与 T3 启动子。

选择何种质粒主要依据各人的偏爱，尽管个别序列的性质会影响转录，如 SP6 转录时经常发现过早终止的转录产物。关于终止信号的性质目前还不是完全清楚[4,8]，但是当其中一种核苷酸低于最适浓度时，转录终止的效应就特别明显。解决这一难题通常将插入片段重行克隆在 T7 或 T3 启动子的前面。当酶与启动子的比例没有严格控制时，T3 RNA 聚合酶局部识别 T7 启动子的结果可能导致两条链同时转录，这可能是形成矫作物的原因之一，特别是当模板线性化的位置正好落在插入片段的内部时。

(3) 尽管转录效率有所降低，特别是使用 SP6 RNA 聚合酶时，但是用小量抽提法抽提的质粒 DNA 仍可使用。小量抽提物中的 RNA 可用胰 RNase 消化（20 μg/ml），然后在纯化线性化的模板的过程中除去。酶切后的小量抽提样品经离心柱处理可提高转录效率。

(4) 由于 RNA 聚合酶可以非特异性地从 3′突出端进行转录，所以酶切时应选用那些能造成 5′突出或是平端的酶[4,9]。如果在合适的位点上只能产生 3′突出端，那么可以利用 T4 DNA 聚合酶或 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段的外切活力切成平末端。将质粒切割不止一处的酶也可以使用，只要不使启动子与插入片段分开。

(5) 质粒的线性化越彻底越好。因为环状质粒是转录效率非常高的模板，所产生的 RNA 分子可以长达 20 kb，从而消耗了大量可利用的核糖核苷酸。

(6) 还存在其他影响转录物的 5′端序列的因素，因为已经证明紧接在起始位点下游的序列可以影响转录延长的方式。前面的 6 个核苷酸对启动子的效率具有强烈的影响。特别是存在着尿嘧啶残基时往往更为不利[6,7]。所以在转录模板 5′端引入 5～6 个与天然 RNA 中不同的核苷酸可能是有必要的。也曾有报道在用 SP6 聚合酶转录时碰到过同样的现象[10,11]。笔者比较了一些复合的 T7 启动子的效率，总结如下：除了 5′端的启动子序列（5′-TAATACGACTCACTATA）外，模板上紧接的六核苷酸序列是：

高效启动子	低效启动子
GGGAGA（T7 保守区）	GTTGGG（5%效率）
GGGCGA（pBS 质粒）	GCTTTG（1%效率）
GCCGAA	

(7) 转录模板3′端的序列应该根据下游引物5′端的序列来确定。但是在转录过程中往往会在3′端出现不依赖于模板的1～2个额外的核苷酸，因而转录的结果通常是一个有着不同3′端的 RNA 群体。群体中3′端增加的各种碱基的比例可能由序列的组成所决定并且也与每一种核苷酸的浓度有关，含量少的核苷酸掺入频率较低[2,6,7,12]。

(8) 各组分加入的次序可以改变，必须记住若没有 DTT 存在时稀释的 RNase 抑制剂是非常不稳定的，并且 DNA 切不可加入到未经稀释的 10×TB 中，所有的组分都必须放在不低于 25℃，目的是防止 DNA-亚精胺复合物形成沉淀。由于放射性的核苷酸是放在一个绝缘得很好的小管中提供的，所以可能在化冻后放置 10～15 min才能达到所需要的温度。笔者经常将除了 RNase 抑制剂与聚合酶外的各组分于 30℃ 放置 15～20 min。若要合成不止一种探针，可将所有组分的反应混合物

加到 DNA 模板中去。可以将总体积减少到 8 μl 以便保存。但是因为酶对表面活性剂的作用很敏感，所以保温应在 400 μl 的管中进行。

(9) 对于 SP6 聚合酶用 4～6 U/μg 的质粒 DNA（大小为 3～4 kb），对于 T7 或 T3 RNA 聚合酶可使用 10～20 U/μg 的质粒 DNA。

(10) 纯化步骤（第 3.3 节，第 4 步）并不一定必需，并且实际上有些研究人员直接将转录混合物用于杂交分析。但是从低背景、一致性以及新合成的 RNA 的定量性来看说明额外所花的时间与精力并不是白费的。

(11) 大于 50％的标记核苷酸的掺入是经常性的，但一般则大于 80％。因而转录时加入 50 μCi 的 RNA 产量可达 4×10^7 Cerenkov-cpm。这表示 125 pmol 的 UMP，并且假定在没有序列偏爱时（即 25％的残基为尿嘧啶）可以产生 130 ng 的 RNA（SA：3×10^8 Cerenkov-cpm/μg）。

尽管 GTP 在贮存过程中很快失去掺入活性，但是当使用标记的 CTP、GTP 时仍能得到相似的结果。ATP 则由于具有较高的 K_m 值[2]而不常使用。UTP 特别稳定，即使把衰变考虑在内也能使用几个星期。每一种标记核苷酸的起始浓度都应大于 12.5 μmol/L，这样才能保证有效地掺入并防止聚合酶延伸的停顿。^{3}H标记的探针也可制备后用于原位杂交（参考文献 13）。

模板 DNA 中加入 10 μg/μg 的 T4 噬菌体基因 *32* 编码的蛋白可提高转录的效率（D.Caput，私人通讯）。最近的研究表明在室温或 30℃进行转录时能防止转录物的提早终止，并且能增加全长转录物（>1 kb）的合成[4,14]。

(12) 不能进入聚丙烯酰胺凝胶中的大分子转录物的出现，说明模板未能全部线性化；小分子的转录物的出现则表明停顿过多或是转录物尚未成熟即已终止。

致　谢

感谢 P.Vassalli 在用 RNA 探针探测稀有 mRNA 的早期工作中所给予的鼓励。在过去几年中，很多同事、学生和技术员对本章所写的实验方法作出过许多贡献，包括 M.Collart, N.Busso, J.-D.Vassalli, H.Krisch, S. Clarkson, J. Huarte, S. Strickland, P. Sappino, M.Pepper, A.Stutz, G.Moreau, D.Caput, M.Prentki, P.Gubler, F.Silva, V.Monney, D.Gay-Ducrest，和 N.Sappino。本项研究工作受到瑞士国家科学基金的资助。

参 考 文 献

1. Butler, E. T. and Chamberlin, M. J. (1984) Bacteriophage SP6-specific RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **257,** 5772–5788.
2. Melton, D. A., Krieg, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K., and Green, M. R. (1984) Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridisation probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* **12,** 7035–7056.
3. Davanloo, P., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J., and Studier, F. W. (1984) Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81,** 2035–2039.

4. Krieg, P. A. and Melton, D. A. (1987) In vitro RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* **155,** 397–415.
5. Yisraeli, J. K. and Melton, D. A. (1989) Synthesis of long, capped transcripts in vitro by SP6 and T7 RNA polymerases. *Methods Enzymol.* **180,** 42–50.
6. Milligan, J. F. and Uhlenbeck, O. C. (1989) Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* **180,** 51–62.
7. Milligan, J. F., Groebe, D. R., Witherell, G. W., and Uhlenbeck, O. C. (1987) Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucleic Acids Res.* **15,** 8783–8798.
8. Roitsch, T. and Lehle, L. (1989) Requirements for efficient in vitro transcription and translation: a study using yeast invertase as a probe. *Biochim. Biophys. Acta* **1009,** 19–26.
9. Schenbon, E. T. and Mierendorf, R. C. (1985) A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: dependence on template structure. *Nucleic Acids Res.* **13,** 6223–6234.
10. Nam, S. C. and Kang, C. (1988) Transcription initiation site selection and abortive initiation cycling of phage SP6 RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **263,** 18,123–18,127.
11. Solazzo, M., Spinelli, L., and Cesareni, G. (1987) SP6 RNA polymerase: sequence requirements downstream from the transcription start site. *Focus* **10,** 11,12.
12. Moreau, G. (1991) RNA binding properties of the *Xenopus* La proteins. Ph.D. thesis, University of Geneva.
13. Sappino, A.-P., Huarte, J., Belin, D., and Vassalli, J.-D. (1989) Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localisation in mouse ovaries and implanting embryos. *J. Cell Biol.* **109,** 2471–2479.
14. Krieg, P. A. (1991) Improved synthesis of full length RNA probes at reduced incubation temperatures. *Nucleic Acids Res.* **18,** 6463.
15. Belin, D.,Wohlwend, A., Schleuning, W.-D., Kruithof, E. K. O., and Vassalli, J.-D. (1989) Facultative polypeptide translocation allows a single mRNA to encode the secreted and cytosolic forms of plasminogen activators inhibitor 2. *EMBO J.* **8,** 3287–3294.

第十三章　非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

Adrian J. Harwood

1. 引　　言

琼脂糖凝胶电泳通常适用于分离从 100 个核苷酸至 10～15 kb 的核酸片段，小于这一范围的 DNA 由于在胶中的扩散而难于分离与观察。这些问题可以用非变性的聚丙烯酰胺凝胶电泳（polyacrylamide gel electrophoresis，PAGE）解决。非变性的 PAGE 分离的片段可以小至 10 bp 大至 1 kb，可分辨 500 bp 中的 1 bp。

非变性的 PAGE 还具有其他优点：它具有相当高的上样容量，当在一个孔（1 cm ×1 mm）中加入多至 10 ng DNA 时分辨率不会有明显的下降。聚丙烯酰胺胶中含有酶反应的几种抑制剂，所以对于亚克隆以及其他分子生物学技术所产生的片段的分离是一个理想的胶系统。但是它有两个缺点：片段的碱基组成会影响它的迁移率，使得精确测定片段的大小成为问题；此外聚丙烯酰胺凝胶会使荧光淬灭，从而使条带中的 DNA 少于 25 ng 时经 EB 染色也很难看到，观察 DNA 片段的其他方法在第十四与十五章和注释 1 中讨论。

本章介绍非变性 PAGE 胶的配制与使用以及在聚丙烯酰胺凝胶切片中进行纯化的方法。

2. 材　　料

2.1　DNA 片段的分离

1）电泳胶装置：各种设计的电泳装置都有成品供应。胶倾倒在以隔条为界的两块垂直板之间（参见注释 2）。

2）去离子水：在配制胶与电泳缓冲液时不一定要用高压灭菌的水，但在稀释样品或是在胶条的纯化中则一定要用灭菌水。

3）10×TBE：108 g Trizma 碱（Tris），55 g 硼酸，9.3 g EDTA（二钠盐），用去离子水加至 1 L。出现沉淀时就不能再用。

4）丙烯酰胺母液：30％丙烯酰胺，1％*N*，*N*′-甲叉双丙烯酰胺，贮存于 4℃。母液能购买到，也可自行配制：将丙烯酰胺与双丙烯酰胺溶于水中后过滤。丙烯酰胺具有神经毒性所以取用必须小心。称取时必须戴上手套与口罩。

5）APS（ammonium persulfate：10％过硫酸铵（w/v），可于 4℃贮存几个月。

6）TEMED：*N*，*N*，*N*′，*N*′-四甲基-1，2-二氨基乙烷。贮存于 4℃。

7）5×上样缓冲液：15％聚蔗糖（Ficoll），2.5×TBE，0.25％（w/v）二甲苯青，

0.025%（w/v）溴酚蓝。

8）EB：10 mg/ml EB 溶液。EB 是高效的诱变剂，取用时必须非常小心，4℃贮存于暗处。

2.2　DNA 片段的纯化

9）洗脱缓冲液：0.5 mol/L 醋酸铵，1 mmol/L EDTA 、pH 8.0。

10）TE：10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，1 mmol/L EDTA，高压灭菌。

11）醋酸钠：3 mol/L 醋酸钠、pH 5.2。

3. 方　　法

3.1　DNA 片段的分离

1）依照表 13.1 将 10×TBE、丙烯酰胺、水和 APS 混合成足够浇灌 18 cm×14 cm×0.15 cm 柱的胶 50 ml。

2）临倒胶前加入 50 μl TEMED 并且转动混匀。

3）立即将胶倒入两块板间并插好梳子。放置待凝固约需 30 min。

4）向电泳槽中加入 0.5×TBE，拔除梳子并用注射针筒多次洗涤点样孔。尽可能除去未聚合的丙烯酰胺是非常重要的，因为它会妨碍样品的泳动（参见注释 3）。

表 13.1　3.5%，5%，12%聚丙烯酸胺凝胶的配制

丙烯酰胺浓度	3.5%	5%	12%
10×TBE	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
丙烯酸胺母液	5.8 ml	8.3 ml	20.0 ml
dH_2O	41.3 ml	38.8 ml	27.1 ml
APS	350.0 μl	350.0 μl	350.0 μl
有效分离范围	100～2000 bp	80～500 bp	40～200 bp

5）样品通常溶在 10～20 μl 的 TE、水或酶切缓冲液中，每一样品中加入 1/5 倍体积的 5×点样液，混匀并稍事离心使内容物集中在管底部（参见注释 4）。

6）将样品加到点样孔中，以 200～300 V（大约 10 V/cm）进行电泳直至溴酚蓝走到靠近底部的 1/3 处。这一过程大约需要 2.5 h（参见注释 5）。

7）拆开电泳装置，将胶浸入 1 mg/ml 的 EB 溶液中染色 30 min。在透射紫外线灯下观察条带。其他的观察方法将在第十四章和注释 1 与 6 中介绍。

3.2　DNA 片段的纯化

不少方法可用来从聚丙烯酰胺胶中回收 DNA，笔者认为破碎浸泡法[1]可以简便而有效地从非变性聚丙烯酰胺或变性聚丙烯酰胺胶中纯化 DNA。

1）用新的解剖刀片将含有 DNA 的聚丙烯酰胺胶条切下，放在 1.5 ml 的离心管内。

2）用黄色的吸嘴将胶条捣碎后加入 1～2 倍体积的洗脱缓冲液。

3）用 Para-film^{TM}封住管口后放在 4℃的转轮上保温，DNA 片段小于 500 bp 时保温 3～4 h，DNA 片段较大时须保温过夜。

4）以 10 000 *g* 离心 10 min 除去碎胶块后小心地吸取上清液，沉淀中加入 0.5 倍体积的洗脱缓冲液，涡旋振荡器上轻微振荡后再次离心。合并两次上清液。

5）上清液中加入 2 倍体积的乙醇，在冰浴中放置 10 min。以 12 000 *g* 离心 15 min。

6）将沉淀溶于 200 μl TE 中并加入 25 μl 3 mol/L 的醋酸钠。加入 400 μl 乙醇后和第 5 步一样再行沉淀。

7）沉淀用 70%的乙醇淋洗后空气干燥。

8）沉淀溶于合适体积的 TE 中，用电泳法检测回收 DNA 片段的量。

4. 注　　释

(1) 正像纯化寡核苷酸时的情况一样，高浓度的 DNA 不用 EB 染色就能在紫外线灯下看见。用可以透过 UV 的塑料薄膜诸如 Saran Wrap 膜将胶包裹后放在含有 UV 荧光指示剂（Merck 60F254，Cat. no.5554）的薄层层析板上观察。长波紫外线可以透过胶照在层析板上使之发光。DNA 浓度高的区域由于吸收了透射紫外线而在板上留下了阴影，可用细钢笔将 DNA 条带的位置标记在 Saran Wrap 膜上以便于切割。

(2) 在倒胶时板上的油脂与污物可以造成气泡，所以倒胶前必须彻底清洗玻璃板并用乙醇擦洗。为了保证拆卸时使胶只贴附于一块板上，可在未装配前对一块板进行硅化处理。硅化手续很容易：可用沾有二甲基二氯硅烷溶液的卷筒纸擦涂玻璃板，然后依次用蒸馏水与乙醇洗涤。如果再将板置于 100℃烘烤 30 min 则硅化可保留以供 4～5 次使用。

(3) 如果分离的片段非常小，小于 50 bp，则在正式电泳前先要进行 30 min 的预电泳，这样能使前沿分子的分辨率增加。

(4) 高盐（大于 50 mmol/L NaCl）会影响样品的迁移，还会使条带破坏，在这样的情况下必须用乙醇沉淀除盐。

(5) 电泳时电压不要超过 10 V/cm，因为高电压会造成胶过热，影响分辨率。可以慢慢地进行电泳，例如使用 75V 电泳过夜。

(6) 如果样品是放射性标记的话（见第十五章），胶须先在 10%的醋酸中固定，然后转移到 3 MM 纸（Whatman，Maidstone，UK）上，干燥后就可进行放射自显影。如果要从胶中分离条带，则可用塑料薄膜将胶包裹后对湿胶进行放射自显影，然后将底片与胶对齐，割下胶上条带并按照 3.2 节的方法纯化。

参 考 文 献

1. Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73,** 668–671.

第十四章　核酸的银染检测

Lloyd G. Mitchell, Angelika Bodenteich, Carl R. Merril

1. 引　　言

银染是一种在丙烯酰胺胶上或者其他膜上检测纳克（ng）级蛋白质或核酸的有效方法。在检测蛋白质与核酸的方法中它显示了比有机染料更高的灵敏度，银染足以检测低至 0.03 ng/mm² 的 DNA[1]。此外银染避免了像 EB 与放射性检测那样的诱变剂的公害。

13 世纪中期时炼金师 Count Albert von Bollstadt 首次记录了硝酸银可使有机材料包括人的皮肤染色。但是直到 1844 年 Krause 才在科学研究中开始用银来染生物组织，接着又被解剖学家 Golgi 与 Cajal 进一步发展了。银染首次使用在聚丙烯酰胺胶上是由组织学的染色法改造而来的。它非常繁琐，需要多步操作与多种试剂，并且整个过程需 3 h[2]，在银染检测聚丙烯酰胺胶上分离的蛋白质或核酸的继续研究中产生了许多简单的方法，也同时使我们扩展了染色机制的知识。

蛋白质与核酸的影像是由于蛋白质或核酸在胶上或膜上所占部位与周围的胶或膜的氧化-还原势不同而产生[3,4]。氧化还原势催化了银离子变为金属银的还原反应。当核酸或蛋白所占的部位具有比周围环境较高的氧化还原势时产生正像（暗色），如果情况相反则产生负像。氧化还原势可以通过改变染色液的化学组成来改变。用核酸及其组分的实验表明嘌呤是银染反应中的活性亚基[5]。

银染法利用三种不同的化学反应：二元胺或氨化物法、非二元胺化学还原法以及光化学法。二元胺银染法最初是为了观察神经纤维而发展起来的[6]，也是首次用在聚丙烯酰胺胶上对分离的生物大分子进行检测。二元胺法染色是建立在氢氧化铵存在时形成银、二元胺复合物的基础上。为了产生影像，含有银、二元胺复合物的溶液必须酸化，最普通的是在甲醛存在条件下用柠檬酸进行酸化。铵离子的减少使银、二元胺复合物中银离子得以释放，这样有利于甲醛将银离子还原为金属银。在显影液中柠檬酸浓度必须精确控制以减少背景中银的沉积。

光显影染色法建立在光线将银离子转变为金属银基础上，这种染色法简单而快速，并且只需少数几种试剂，但灵敏度较其他方法为低[7]。

绝大部分非二元胺化学还原染色法是从光化学方法发展起来的[3]。它们使用了在酸性条件下能与生物大分子发生反应的硝酸银，然后通过在碱性条件下甲醛对银离子进行选择性还原。往往加入碳酸钠使显色过程维持碱性，因为甲醛能被氧化成为甲酸。非二元胺的化学染色法既快速又容易操作，这个方法对于厚度在 1 mm 以下的胶都能很好地染色，这里所介绍的非二元胺银染色方法能在 40 min 内完成，所用的试剂可放置几个月保持稳定。

2. 材　　料

所有的试剂都必须用电导小于 1 μmho 的超纯去离子水配制。水中不能含有无机离子或有机污染物，因为这些污染物经常使背景染色。由于银染液是一种非常好的蛋白检测剂，所以必须注意防止皮肤上的蛋白质或是其他的污染源与胶或试剂接触。

银可以用来染色非变性的和变性的丙烯酰胺胶，也能用于不连续缓冲系统的和不同交联程度的脱水的胶[8]。我们推荐使用厚度为 0.4 mm 的胶（参见注释 1）。

银染溶液易于配制，除了显色剂外其余的试剂可稳定贮存 6 个月。它们也可以在实验过程中配制。

1）固定剂：10％乙醇（v/v）（参见注释 2）。

2）氧化剂：0.0034 mol/L 的重铬酸钾（1 g/L）与 0.0032 mol/L 的硝酸（或 0.2 ml 16 mol/L 的浓硝酸）（参见注释 3）。硝酸溶液有刺激性，应防止接触皮肤。并且这溶液是强氧化剂，所以放置时必须远离还原剂；它还是一个光敏试剂，所以必须贮存在棕色瓶或是避光的瓶中。

3）银盐溶液：20％的硝酸银（2 g/L）（参见注释 3）。硝酸银溶液可腐蚀眼睛与黏膜，也可使皮肤或衣服染色。应贮存在棕色瓶或避光的瓶中。

4）显影剂：0.28 mol/L 的碳酸钠（30 g/L）加上 0.5 ml/L 的 37％的甲醛水溶液（参见注释 4）。临用前混合。此溶液必须在 4℃ 使用并且也贮存于这一温度。由于甲醛的蒸气可能是致癌剂，所以须在通风橱中进行操作。

5）终止液：5％（v/v）醋酸。

3. 方　　法

核酸经电泳分离后，将每一块聚丙烯酰胺胶分别放在一个干净的玻璃或塑料盘中。戴上洗去粉末的聚乙烯或乳胶手套，穿上实验衣可减少胶污染的危险性，并能防止使实验人员染上颜色。除了显色剂外其余的溶液都能于室温保存，显色剂使用前要放在 4℃ 预冷，实验室中柔和的背景光线有利于降低背景染色。并且显色也不能在透光的盒子中进行。处理胶时必须动作温和，避免因胶的破损而造成矫作物。溶液不能直接倒在胶上面，应使盘倾斜后将溶液倒在盘的角上，或者将每种溶液各放一盘，然后将胶从一个盘转到另一个盘。溶液的体积必须足够将胶全部浸没。在显色过程中盘子须轻轻地摇动。

1）电泳分离结束后将胶浸泡在固定液中 10 min，（参见注释 5），固定液的体积须比恰好浸没胶时再多一倍（参见注释 6），如果显色反应不能立即进行，胶可放在固定液中无限期地保存下去。

2）将胶放在重铬酸盐氧化剂中浸泡 3～5 min（参见注释 7），倾滗倒去氧化剂，用去离子水洗三次，每次 3～5 min（参见注释 7 与 8）。

3）将胶放在硝酸银溶液中浸泡 15～20 min（参见注释 9）。用去离子水洗涤一次（20～30 s）以除去胶表面的硝酸银（参见注释 10）。

4）在均匀摇动中用预冷的显影液洗涤胶块约 30 s 以促使影像出现（参见注释 11）。仔

细观察显影进程，当溶液开始混浊时尽快倒出显影液（参见注释 12)。倒入新鲜的显影液，同样在开始混浊时尽快倒出显影液。重复这一过程直到影像出现或者背景已染色较深为止。

5) 当 DNA 条带与背景相比出现令人满意的深度时将胶浸在 5%的醋酸溶液中终止反应(参见注释 13 与 14)。DNA 条带通常以深棕色或黑色出现在浅黄至棕色的背景上(参见图 14.1)。

固定在聚酯薄膜上的已染色的胶可在微波炉中干燥或放在空气中晾干。没有烘干的胶可放在玻璃纸或是滤纸上稍加热并抽真空干燥。如果需要永久性的图像，可摄影保存，因为用本法进行银染的条带随着时间的推移而变深。

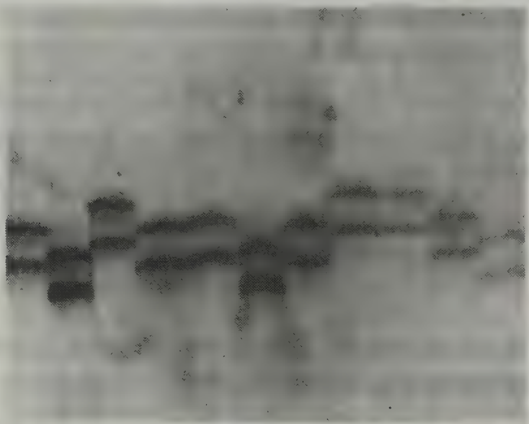


图 14.1 典型的银染胶。胶上含有从不同个体得来的富含 AC 重复序列的部分线粒体 DNA。DNA 经 PCR 扩增并从每一反应产物中取 1 μl（8～35 ng/μl)，加入 3 μl 含有甲酰胺的点样液后 96℃ 保温 1 min 进行变性。DNA 在含有 6 mol/L 尿素的 6%聚丙烯酰胺凝胶上于 55℃ 进行电泳。凝胶是固定在 GelBond PAG（FMC，Rockland，ME）上的。图中同时显示出用这种技术可能发生的胶表面矫作物的情况。

4. 注　　释

(1) 胶越薄染色越快，但薄的胶易碎不便于操作，而厚度大于 0.7 mm 的胶染色需较长时间。为了增加胶的耐久性，对于厚度在 0.7 mm 以下的胶我们建议将它固定在聚酯膜（例如 GelBond PAG，FMC，Rockland，ME 或 Gel-Fix，Serva，Heidelberg，Germany）上。或者，胶也可以固定在硅化的玻璃板上（Bind-Silane，Pharmacia-LKB，Piscataway，NJ)。固定在聚酯膜上的优点是电泳后可以对不含 DNA 的部分修剪掉以减少染色溶液的用量。

如果利用聚酯膜固定凝胶，则必须在固定前将聚酯膜平整好并通过毛细管吸引使膜紧贴在电泳仪的玻璃板上。为了完成这一操作先将几毫升蒸馏水或 5%甘油滴到板上然后再放上聚酯膜。必须注意使不固定凝胶的一面与玻板接触。聚酯膜可用印刷橡胶棍或移液管弄平，除去所有的气泡和不平整之处方能使凝胶厚度一致，这是非常重要的。为了防止移液管滚动时聚酯膜的移动，可在胶底部的薄

膜与玻璃板之间加上一滴硅油使它形成一层薄膜。聚酯膜必须大到足以能盖住胶、点样孔以及在膜的顶部的隔条。聚酯膜与隔条就位后便可像平时那样操作了。

(2) 甲醇可以代替乙醇，但通过皮肤接触或呼吸甲醇可使操作人员中毒。聚丙烯酰胺胶分离 DNA 或蛋白质所用的许多其他固定液中都含有醋酸，但是这里所用的固定液中不含醋酸，不含醋酸时条带会更深一些。

(3) 这一溶液也可以配成 10× 的母液。

(4) 浓的甲醛母液通常是 37%。

(5) 厚度大于 0.7 mm 的胶固定时间需要 20 min，如果使用预热到 40～50℃ 的固定液时固定时间可以缩短。

(6) 固定的作用除了能减少 DNA 在胶中的扩散外，还能除去可能干扰染色的缓冲液离子与胶中的其他化学物质（例如尿素）。

(7) 厚度小于[1]0.7 mm 的凝胶浸泡 10 min。

(8) 洗涤时重要的一点是要将胶中重铬酸盐的浓度降得很低，直到看不出黄颜色为止。如果胶中的重铬酸盐氧化剂仍呈黄色或是转变成红色，应用 0.01 mol/L 的硝酸洗涤脱色。

(9) 如果胶的厚度大于 0.7 mm 时须浸泡 25～30 min，如果这步操作中存在任何污染物，特别是氯化物，就可能产生银沉淀。这种沉淀往往使银染的灵敏度降低并且使背景增加。

(10) 如果这步洗涤时间过长则会使银扩散到胶外去反而降低了灵敏度。

(11) 使用冷的显影剂便于控制显影的进程。

(12) 当银离子从胶中逸出时会形成棕色的碳酸银沉淀。如果溶液调换不及时，沉淀便沉积在胶的表面。

(13) 如果显影过度或是由于银在胶表面的沉积而形成银镜时可用下法进行脱色处理：取 37 g 无水硫酸铜与 37 g 氯化钠溶在 850 ml 的去离子水中。在不断的搅拌下加入浓的氢氧化铵直到溶液变成深蓝色并且没有沉淀为止，再将溶液的体积调节到 1 L。另外须配制第二种溶液：在 1 L 去离子水中含有 436 g 的五水合硫代硫酸钠。临用前将两种溶液等体积混合，胶浸在这个溶液中直至几乎完全清澈。用 10% 的醋酸浸泡 15 min 使脱色反应终止，然后用去离子水洗涤至少 1 h，几次更换洗涤液。胶可以从硝酸银步骤开始重新染色（第 3 步），重新染色时不需要重铬酸钾盐步骤。脱色步骤也可用于去除衣服上染上的银。

(14) 胶表面有些矫作物条带或沉淀可在胶干后用湿润的药棉擦去，此处理应该先在不重要的区域试用，当擦拭到胶表面有些黏糊时即应停止擦拭，但胶干后仍可继续进行。

---

1) 原文为大于。——译者注

参考文献

1. Goldman, D. and Merril, C. R. (1982) Silver staining of DNA in polyacrylamide gels: linearity and effect of fragment size. *Electrophoresis* **3,** 24–32.
2. Merril, C. R., Switzer, R. C., and Van Keuren, M. L. (1979) Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76,** 4335–4339.
3. Merril, C. R. (1987) Development and mechanisms of silver stains for electrophoresis. *Acta Histochem. Cytochem.* **19,** 655–667.
4. Merril, C. R. (1990) Silver staining of proteins and DNA. *Nature* **343,** 779–780.
5. Merril, C. R. and Pratt, M. E. (1986) A silver stain for the rapid quantitative detection of proteins nucleic acids on membranes or thin layer plates. *Anal. Biochem.* **156,** 96–110.
6. Bielschowsky, M. (1904) Die silberimpragnation der neurofibrillen. *J. Psychol. Neurol.* **3,** 169–189.
7. Merril, C. R., Harrington, M., and Alley, V. (1984) A photodevelopment silver stain for the rapid visualization of proteins separated on polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **5,** 289–297.
8. Allen, R. C., Graves, G., and Budowle, B. (1989) Polymerase chain reaction amplification products separated on rehydratable polyacrylamide gels and stained with silver. *Biotechniques* **7(7),** 736–744.

第十五章　DNA 片段的末端标记

Adrian J. Harwood

1. 引　　言

末端标记无论是对于 DNA 片段的放射性或是非放射性标记而言都是快速与灵敏的方法，对于 EB 染色不能看到的少量 DNA 也可以用这种方法进行标记，而这是用聚丙烯酰胺凝胶分离小片段 DNA 时一个困难的问题（参见第十三章）。末端标记的第二个优点是能够产生标记在 DNA 片段的一个末端的片段。由于所有使用的酶不是对 DNA 的 3′端就是对 DNA 的 5′端有特异性，所以每次只能在 DNA 的一条链上标记。对使用限制性内切酶切割的双链 DNA 进行标记时掺入反应发生在链的两端，但可以用第二次酶切的方法将一端除去。当 DNA 片段克隆到多位点接头（polylinker）上时进行这种操作就很方便，因为切去一小段 DNA 就能去除一个末端，使以后的纯化步骤易于进行。这些一端标记的分子有助于限制性酶切片段的排列，并且是 Maxam-Gilbert DNA 测序法的先决条件（参见第五十三章）。末端标记的合成的寡核苷酸应用很多，例如 DNA 短序列-特异性探针可用于突变的筛选[1]，用于胶阻滞测定和 Southwestern 测定[2]，以及用于被其他寡核苷酸污染了的样品的 PCR 产物的测序工作（参见四十九章）。

末端标记有两种常用的方法：填入法与激酶反应法。使用末端转移酶也可以标记

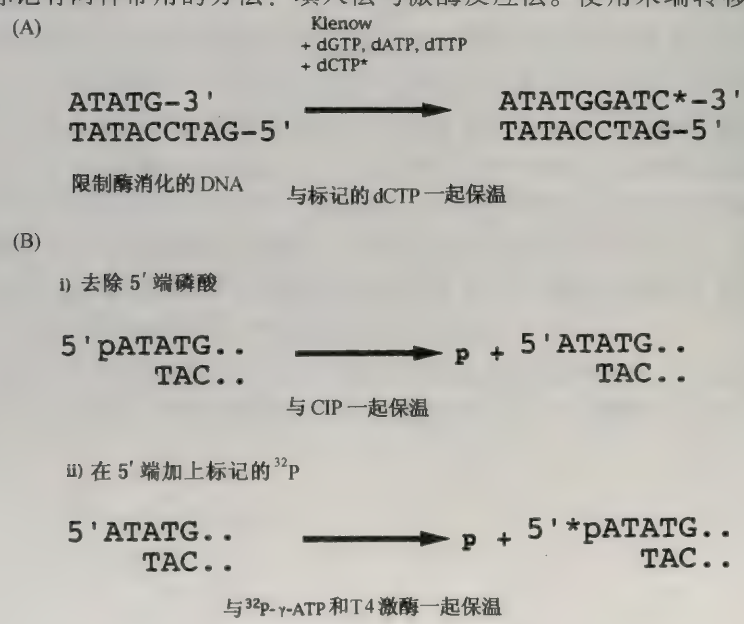


图 15.1　(A) 填入反应法。　(B) 激酶反应法。

3′端[3]，但这种方法现在已很少使用了。填入标记用的是大肠杆菌 DNA 聚合酶的 Klenow 片段[4]。这个片段是 DNA 聚合酶经酶切后产生的，它保持了聚合活性与 3′→5′的外切活性，但去除了 5′→3′的外切活性。须进行末端标记的 DNA 片段首先要用限制酶进行切割以产生 5′突出端，然后用 DNA 聚合酶的 Klenow 片段以 5′突出部分为模板对 3′缩进端进行延伸，如图15.1(A)。由于这种方法易于进行，所以常被用于标记双链 DNA。当 DNA 片段没有合适的末端或是需要标记的 DNA 是单链时就必须用激酶法了。激酶反应是利用 T4 多核苷酸激酶（T4 polynucleotide kinase，T4 激酶 ）将标记的磷酸盐转移到 DNA 分子的 5′端，如图15.1(B)。这个方法对于标记寡核苷酸非常理想，因为合成的寡核苷酸的 5′端是没有磷的。对限制性酶切的 DNA 片段进行标记时先要用磷酸酯酶除去末端的磷酸根，例如用小牛肠碱性磷酸酯酶（Calf Intestinal Alkaline Phosphatase，CIP）。所有这些反应也都可以用不标记核苷酸来进行，用以修饰 DNA 片段以便进一步进行 DNA 重组操作。

2. 材　　料

可能条件下应使用分子生物学级的试剂。操作应在 1.5 ml 灭菌的一次性聚丙烯管中进行，螺口盖子可以防止放射性物质的泄漏。当使用放射性物质时必须遵守本地的安全条例。

2.1　用 Klenow 片段进行末端标记

1）10 × Klenow 片段缓冲液：200 mmol/L Tris-HCl、pH 7.6，100 mmol/L $MgCl_2$，15 mmol/L β-巯基乙醇与 25 mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）。
2）标记的核苷酸：^{32}P-α-dNTP，通常以 dATP 或 dCTP 供应，但是 dGTP 与 dTTP 也可以购得。它们也可以用非放射标记物取代，例如荧光素-11-dUTP 与地高辛-11-dUTP。
3）不标记的 dNTPs：
   a：dNTP 混合物：混合物中含有除了标记核苷酸之外的 0.25 mmol/L 的各种非标记核苷酸（参见注释 1）。
   b：非放射性标记的 dNTP：0.25 mmol/L 的 dNTP，相当于标记核苷酸（参见注释 1）。
4）Klenow 片段：1 U/μl DNA 聚合酶 I 的 Klenow（大）片段。贮存于 −20℃。
5）TE：10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，1 mmol/L EDTA。高压灭菌后贮存于室温。
6）酚：含有 0.1% 8-羟基喹啉（抗氧化剂）的 Tirs-HCl 平衡过的酚。使用重蒸过的超纯酚，用 0.5 mol/L Tris-HCl、pH 8.0 的溶液反复抽提直至水相的 pH 值达到 8.0，然后再用 pH 8.0 的 0.1 mol/L Tris-HCl 抽提一次，这样处理的酚在 4℃ 至少可贮存两个月。酚既有腐蚀性又有毒性，所以使用时必须非常小心。
7）氯仿。
8）酚/氯仿混合物：0.1 mol/L Tris-HCl、pH 8.0 溶液平衡过的酚中加入等体积的氯

仿，4℃中至少可以贮存两个月。

9）乙醇和70%的乙醇（v/v溶于水中）。

10）5 mol/L 醋酸铵，pH 7.5，贮存于室温。

2.2 用T4激酶进行末端标记

11）10×CIP缓冲液：10 mmol/L $ZnCl_2$，10 mmol/L $MgCl_2$，100 mmol/L Tris-HCl、pH 8.3。

12）CIP：1 U/μl 的小牛肠碱性磷酸酯酶（Bochringer Mannhiem Gmbh，Mannheim，Germany），贮存于4℃。

13）10×激酶缓冲液：700 mmol/L Tris-HCl、pH 7.6，100 mmol/L $MgCl_2$，50 mmol/L DTT。

14）$^{32}P-\gamma-ATP$：比活＞3000 Ci/mmol。

15）T4激酶：1 U/μl 的T4多核苷酸激酶。贮存于－20℃。

16）非放射性标记的ATP：1.0 mmol/L ATP（临用前从20 mmol/L贮存液新鲜配制）。

3. 方　　法

3.1 用Klenow片段进行末端标记

1）将1～1000 ng的DNA溶于42 μl的蒸馏水中（参见注释2）加入5 μl 10×Klenow片段缓冲液，1 μl $^{32}P-\alpha-dNTP$，1 μl dNTP混合物和1 μl Klenow片段。室温放置15 min（参见注释3）。

2）追加1 μl非放射性标记的dNTP，室温再次放置15 min（参见注释1）。

3）先加50 μl TE，再加100 μl酚/氯仿。短暂涡旋振荡后在台式微型离心机上以12 000 *g*离心（参见注释4和5）。

4）将水相（上层）转移到干净管子中并加入100 μl酚/氯仿。按第3步操作使溶液分层，然后将上层水相转移到干净的管子中。必须注意丢弃的试剂中尚污染有未掺入的$^{32}P-\alpha-dNTP$。

5）加入60 μl 5 mol/L（0.6倍体积）的醋酸铵与200 μl（2倍体积）的乙醇（参见注释6）后在冰上放置5 min。以12 000 *g*离心15 min，小心倒去上清液（记住这是含放射性物质的），用70%乙醇洗涤沉淀。

6）空气干燥沉淀10 min后悬浮于适量的TE中（10～100 μl）。

标记的DNA可以立即用凝胶电泳法分离，并用放射自显影法进行检测（参见注释7），或者用第二种限制性内切酶再作切割。不论是哪一种情况，建议用1 μl样品在液闪计数器中进行计数。用放射自显影检测DNA片段时放射活性必须达到5000～10 000 cpm。标记效率不高的原因和可能的解决方法在注释8～10中讨论。

3.2 用 T4 激酶进行末端标记

1）将 1～2 μg 经限制酶切割的 DNA 溶解在 44 μl 的蒸馏水中，加入 5 μl 10×CIP 缓冲液后再加入 0.05～1 U 的 CIP（参见注释 11）。37℃ 保温 30 min（参见注释 12 和 13）。

2）60℃、10 min 灭活 CIP。酚抽提后按 3.1 节中第 3～5 步同样进行沉淀（参见注释 14 和 15）。

3）将 DNA 悬浮在 17.5 μl 的蒸馏水中，加入 2.5 μl 10×激酶缓冲液，5 μl ^{32}P－γ－ATP 以及 1 μl T4 激酶，37℃ 保温 30 min。

4）加 1 μl 非放射性标记的 ATP 并继续保温 30 min（参见注释 16）。

5）酚抽提后按 3.1 节中第 4～6 步进行沉淀（参见注释 17）。

4. 注　　释

（1）须要加入非标记的 dNTPs 理由有两个。第一，因为标记的核苷酸可能不是酶切位点中须要填补的第一个核苷酸，例如图 15.1A 是 *Ban*HI 的酶切位点，标记的 dCTP* 相当于第四个核苷酸，所以在标记核苷酸掺入前必须由其他三个非标记的核苷酸填补进去。实际上为了方便，不管酶切位点如何，都使用 7.5 mmol/L 的不标记的 dNTPs 混合物。第二，为了得到平末端，需要追加 dNTPs，因为标记核苷酸的浓度极低时 DNA 聚合酶的合成就会停止。但是当末端大小不同不成为问题时这一步也可以省略，例如在标记大片段 DNA 后用琼脂糖凝胶电泳分离的实验中。

（2）填入反应是非常粗放的，在 Mg^{2+} 存在时填入反应几乎能在任何缓冲液中进行。这意味着只要向限制酶作用后的反应系统中加入标记的 dNTP、不标记的 dNTPs 以及 Klenow 片段就能进行标记反应了。

（3）由于标记反应仅仅发生在 DNA 片段的一个小区域中，反应进行得很快，所以在室温放置即可。除非使用 ^{32}S－dNTP，标记反应才须在 37℃ 中进行，但过份延长保温时间可导致 DNA 末端的降解。

（4）标记的 DNA 可以用来进行凝胶电泳，但必须记住 DNA 溶液中尚留有未掺入的 ^{32}P－α－dNTP，这就增加了电泳操作人员与放射性物质的接触危害性。

（5）另一个方法是将 DNA 通过 Sephadex G50 离心柱进行纯化（见第四十九章）。

（6）如果 DNA 的量很少可能须加入载体，例如 10 μg tRNA 或是糖原。

（7）为了防止污染胶干燥器，在胶干燥前必须放在 10% 的醋酸或三氯醋酸（TCA）中固定。

（8）Klenow 片段很少受到抑制剂的影响，但无底物时的保温却很快使它失活。它可能是常用酶中首先失活的一种。如果对酶活存有疑问，可先标记对照 DNA 进行检查。通常用相对分子质量标准 DNA 即可，但进行反应前应先核对末端的结构。

（9）末端的结构非常重要，因为酶只能填补那些存在于这些位点中的碱基。须再次核对限制性内切酶切割所产生单链末端的序列。也可能须用另一种高比活的 dNTP 代替

$^{32}P-\alpha-dNTP$。

(10) Klenow 片段填补反应仅仅在每个 DNA 分子中掺入少数的^{32}P标记的核苷酸分子。如果须要大量地掺入时，可选用 T4 DNA 聚合酶。T4 DNA 聚合酶具有比 Klenow 片段高 200 倍的 3′→5′外切活力。如果 DNA 片段在无 dNTP 时保温，此酶将使它产生一个单链 DNA 的区域，这个区域可以在以后的标记反应中被加入的$^{32}P-\alpha-dNTP$ 和非放射性标记的 dNTPs 混合物高度标记[5]。

(11) 一个单位的 CIP 在 1 h 内去除 50 pmol 的末端磷（对于 5 kb 的片段，1 pmol 的末端大约相当于 2 μg)。

(12) 为了提高平末端和 5′缩进端脱磷的效率，反应可在 55℃进行。

(13) 磷酸酯酶反应可以在限制酶缓冲液中进行，在该缓冲液中加入 0.1 倍体积的 500 mmol/L Tris-HCl、pH 8.9，1 mmol/L 的 EDTA 和适量的酶即可。

(14) 防止新掺入的标记磷被去除，非常重要的一点是在反应结束后灭活所有的磷酸酯酶。

(15) T4 激酶的催化反应对抑制剂如琼脂糖中存在的某些物质非常敏感，所以必须非常小心地确保 DNA 中没有抑制剂。此外，由于 T4 激酶很容易使 RNA 分子磷酸化，所以必须避免样品中存在 RNA 分子，以防止^{32}P掺入 DNA 分子的效率严重降低。

(16) 标记反应的效率大约为 10%，为了使所有的分子都能磷酸化必须追加过量的非放射性标记的 ATP。

(17) 这是一个不高明的纯化寡核苷酸的方法，笔者推荐用 Sephadex G25 离心柱（参见第十九章)。

参 考 文 献

1. Wallace, R. B., Shaffer, J., Murphy, R. F., Bonner, J., Hirose, T., and Itakura, K. (1979) Hybridisation of synthetic oligodeoxyribonucleotides to ϕχ174 DNA: the effect of single base pair mismatch. *Nucliec Acid Res.* **6,** 3543–.
2. Harwood, A. J., ed. (1994) *Protocols for Gene Analysis. Methods in Molecular Biology,* vol. 31. Humana, Totowa, NJ.
3. Walker, J. M., ed. (1984) *Nucleic Acids. Methods in Molecular Biology,* vol. 2. Humana, Clifton, NJ.
4. Klenow, H., Overgaard-Hansen, K., and Patkar, S. A. (1971) Proteolytic cleavage of native DNA polymerase into two different catalytic fragments. *Eur J. Biochem.* **22,** 371–381.
5. Challberg, M. D. and Englund, P. T. (1980) Specific labelling of 3' termini with T4 DNA polymerase. *Methods Enzymol.* **65,** 39–43.

第二部分
RNA 分析

第十六章 Northern 印迹分析

Robb Krumlauf

1. 引 言

在基因表达的分析中，RNA 转录的稳态水平是监测细胞株和组织的基因表达活性的最方便的参数之一。有多种方法可用于测定 RNA 水平，诸如 S1 杂交、RNase 保护法和 Northern 印迹。选择何种检测系统最佳主要取决于需要哪一种形式的信息、检测的灵敏度以及在活体系统中特殊的限制因素等。本章将详细介绍应用 Northern 印迹分析 RNA 的方法，其中主要包括 RNA 提取、电泳分离、膜转移、核酸杂交检测和放射自显影。

Northern 印迹有许多优点。基因的转录模式往往是复杂的，同一基因可产生多种 RNA 产物，Northern 印迹可提供来自一个基因的 RNA 种类的数目、分子大小及丰度等信息，这是其他方法所不能做到的。这一技术还可将 RNA 保留在膜上供反复检测。因此几个基因的表达可以在同一份 RNA 样品中进行检测，只要使用多种探针与膜再杂交即可。Northern 印迹有两个缺点，一是从组织或细胞提取的 RNA 必须是高质量的和未降解的，从某些组织中提取 RNA 或是对于没有经验的操作人员来讲，这可能是困难的。但是这对于 S1 杂交或 RNase 保护法则不成问题，因为在这些方法中用酶降解 RNA 是其过程的一部分。与这两个方法相比，Northern 印迹法通常被认为是灵敏度较低而且操作步骤较多的，所以要用大量的起始样品或 RNA 以及更多的时间才能得到结果。

Northern 印迹法的许多问题可以通过优化将 RNA 转移和结合到膜支持物上的条件以及使用高灵敏度的单链探针等得到改善。尼龙膜如 GeneScreen™（杜邦公司产品）是韧性好、抗撕裂的支持物，RNA 经紫外线交联后可永久结合于膜上。经紫外线交联后的 RNA 膜的一大优点是可以使用严格度非常高的杂交条件，这样可提高灵敏度，降低背景以及方便地多次重复使用同一张膜。在许多可以获得高浓度的 RNA 样品或大量的样品的情况下，这些可能不是关键的因素。不过经常要从一些非常难得的小量组织或细胞（例如转基因鼠、临床标本、胚胎材料）中分离 RNA。在转染实验中，也应尽量节省用于 RNA 分析的量，以便能够检验更多的 DNA 结构，并减少培养细胞的量。在这些情况下，优化实验条件是很必要的。使用单链探针能够大大提高灵敏度，但可能产生很高的背景，这是由于它与各种 rRNA 可以发生非特异性杂交，尤其是在使用总 RNA 时。因此即使在总 RNA 量很少时，分离 $polyA^+$ RNA 也是有利的。只分析 $polyA^+$ RNA 可改善信噪比，避免上样 RNA 过多导致 RNA 与膜结合不完全。

RNA:RNA 杂种分子是非常稳定的，杂交时往往不使用一般的严格条件，因为那将导致高背景或对其他种类的 RNA 的交叉杂交。提高杂交和洗涤的严格度可使非特异性信号大为减少甚至消失。但如果 RNA 没有通过紫外线交联到滤膜上，这些严格的条件

也将洗去大部分样品以致损失信号。这样的条件对于硝酸纤维素膜来说也过于强烈，可导致膜变脆和碎裂。这也说明为什么必须使用尼龙膜方能获得理想的和可重复的结果。杂交液的选择不必十分严格，但尽可能降低杂交和洗涤的温度可以减少 RNA 降解和增加滤膜的重复使用寿命，也可以在缓冲液中加入甲酰胺以降低杂种分子的解链温度。

按上述方法优化的 Northern 印迹法可达到 RNase 保护法或 S1 分析法的灵敏度，并且对重要样品提供长期保存的记录，从而可以反复进行分析。本章详述高灵敏度的 Northern 印迹法步骤，这些方法已成功地用于检测早期胚胎组织和转基因鼠等样品中表达程度极低、表达量极少的那些基因[1~3]。总的来说，这一实验步骤与已有的 Northern 方法并无很大差别，除了紫外灯之外也不需特殊仪器。本方法基于这样一些简便的步骤：分离提取高质量的 polyA$^+$ RNA，紫外线交联 RNA 到尼龙膜上，与单链 RNA 探针杂交。它同样适用于各种类型的或具有种种困难的 Northern 印迹分析上，并且其他的 RNA 分离和杂交方法也可以替代应用于本方法中，对效率和结果几乎没有影响。在多数情况下 DNA 探针也可用，但灵敏度低于单链 RNA 探针。

2. 材　　料

RNA 的分离提纯要求高纯度的试剂和小心操作以免 RNA 降解。建议在全过程中戴手套。重金属或其他污染物可导致 RNA 的化学裂解，因此必须使用去离子蒸馏水和高级别的分析试剂，仅高压灭菌不足以灭活污染进来的 RNase，因为在热变性之后可以复性。二乙基焦碳酸盐（diethylpyrocarbonate，DEPC）可与 RNase 结合，从而使灭活不可逆。因此 DEPC 处理成为制备无 RNase 溶液的最方便方法（注意：DEPC 为致癌剂，应戴手套）。

2.1　RNA 的分离

2.1.1　氯化锂-尿素法

1）DEPC 处理的水：每升去离子水中加 1～2 滴 DEPC，振荡混合，高压灭菌。这样灭菌可将 DEPC 分解为乙醇、CO_2 和水。

2）匀浆用缓冲液：3 mol/L LiCl，6 mol/L 尿素。将 126 g LiCl 和 360 g 尿素溶于 1 L 灭菌的 DEPC 水中，用厚度为 0.2 mm 的滤纸过滤。

3）2 mol/L Tris-HCl、pH 7.6：用 DEPC 处理的水制备缓冲液，调节 pH 值至 7.6，置于玻璃瓶中，加 1～2 滴 DEPC，振荡混匀，立即高压灭菌。DEPC 可破坏 Tris，所以在高压灭菌后应核实 pH 值。稀释的 Tris 缓冲液切不可用高压灭菌。

4）0.5 mol/L EDTA：配制 EDTA 贮存液，加入 1～2 滴 DEPC，高压灭菌。

5）10%SDS：配制 SDS 贮存液，加入 1～2 滴 DEPC，68℃保温过夜，不要高压灭菌。

6）3 mol/L 醋酸钠，pH 5.2：调节醋酸钠贮存液至 pH 5.2，加 DEPC 1～2 滴，高压灭菌。

7）95% 乙醇。

8）重蒸酚（Gibco-BRL）：65℃熔化，用等体积 TES 饱和，静置过夜，加 5 ml *m* -甲

酚、0.2 ml 的 2-巯基乙醇、0.1 g 8-羟-奎啉至 100 ml 酚中。混合至完全溶解，然后尽量移去水相层。

9）酚/氯仿/异戊醇（24:24:1）：用处理过的酚（第 8 步）、AR 级的氯仿和异戊醇配制。置避光处，不宜久藏。

10）TES：10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.6，1 mmol/L EDTA，0.5%SDS。用 DEPC 处理的水、DEPC 处理的 2 mol/L Tris-HCl、pH 7.6 和 0.5 mol/L EDTA 贮存液配制。

11）TE：10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.6，1 mmol/L EDTA。用 DEPC 处理的水、DEPC 处理的 2 mol/L Tris-HCl 和 0.5 mol/L EDTA 贮存液配制。

12）灭菌的无 RNase 的一次性离心管：小量制备时用标准的 1.5 ml Eppendorf 管。若戴手套可直接从盒中取用。Falcon 公司还提供 5 ml（#2063）、15 ml（#2059）以及 50 ml（#2070）灭菌的聚丙烯管。

2.1.2 热 酚 法

1）50 mmol/L 醋酸钠、pH 5.2：加 1～2 滴 DEPC，高压灭菌。

2）5 mol/L NaCl：加 1～2 滴 DEPC，高压灭菌。

3）饱和酚：熔化重蒸酚（Gibco-BRL），加 0.25 倍体积的 50 mmol/L 醋酸钠，pH 5.2，混匀，静置使其分相，尽量除去水相。小份分装贮存于 -20℃ 备用。分离 RNA 后未用完的酚宜再次冷冻。

4）NaCl/冰糊：加 NaCl 至冰中，混合至温度降到 -10～-13℃。

2.2 polyA$^+$ RNA 的分离

1）寡聚 dT 纤维素：用 T3 级（Collaborative Research Labs，USA）。

2）0.1 mol/L NaOH：用 Analar 级 10 mol/L NaOH 贮备液加 DEPC 处理的水稀释。

3）6 mol/L LiCl：252 g LiCl 溶于 1 L 水，加 1～2 滴 DEPC，高压灭菌。

4）结合缓冲液：20 mmol/L Tris-HCl、pH 7.6，0.6 mol/L LiCl，1 mmol/L EDTA，0.2%SDS（用无 RNase 的贮存液和 DEPC 处理的水制备）。

5）低盐结合缓冲液：20 mmol/L Tris-HCl、pH 7.6，0.1 mol/L LiCl，1 mmol/L EDTA，0.2%SDS（用无 RNase 的贮存液和 DEPC 处理的水制备）。

6）洗脱缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.6，1 mmol/L EDTA，0.1%SDS（用无 RNase 的贮存液和 DEPC 处理的水制备）。

7）塑料的寡聚 dT 柱，顶端和底部塞子和能放置 20 根柱的架子：Isolabs（Cleveland，OH）（Quicksep # QS-P）或 Advanced Labs Techniques（Tunbridge Wells，Kent，UK）等公司产品。

2.3 电泳、转移和交联

1）20×MOPS 贮存液：0.4 mol/L MOPS，0.1 mol/L 醋酸钠，20 mmol/L EDTA。用 DEPC 处理的水制备1 L 溶液时溶解83.6 g MOPS，8.2 g 醋酸钠，40 ml 0.5 mol/L

EDTA贮存液。

2）琼脂糖：Seakeem 牌号。

3）甲酰胺：不必去离子。

4）37％甲醛，有液体贮存液供应。

5）蓝色液体染料：0.1％二甲苯青，0.1％溴酚蓝，1×MOPS，50％甘油，用 DEPC 处理的水和高压灭菌的甘油配制。

6）0.1 mol/L 醋酸铵。

7）20×SSC：3 mol/L NaCl，0.3 mol/L 柠檬酸钠。用高压灭菌的蒸馏水稀释至 6×SSC和 2×SSC。

8）变性用缓冲液：50 mmol/L NaOH，0.1 mol/L NaCl。

9）中和用缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl、pH 7.6，用 DEPC 处理的水稀释。

10）尼龙膜：200 mm×200 mm，例如 Gene Screen（参见注释 1）。

11）Whatman 3 MM 滤纸，吸水纸巾，塑料薄膜（Saran Wrap^{TM}）。

2.4 杂　　交

1）50×Denhardt 氏溶液：0.05％（w/v）BSA，0.05％（w/v）聚乙烯吡咯烷酮，0.05％（w/v）聚蔗糖 400（Ficoll 400）。

2）预杂交缓冲液：50％～60％甲酰胺，5×SSC，5×Denhardt 氏溶液，50 mmol/L 磷酸钠缓冲液，pH 6.8，250 μg/ml 经剪切的变性鲑鱼精子 DNA，100 μg/ml 酵母 tRNA，1％ SDS。用 DEPC 处理的水配制。

3）杂交缓冲液：50％～60％甲酰胺，5×SSC，5×Denhardt 氏溶液，50 mmol/L 磷酸钠缓冲液、pH 6.8，250 μg/ml 经剪切的变性鲑鱼精子 DNA，100 μg/ml 酵母 tRNA，1％SDS（v/v），10％硫酸葡聚糖（w/v），合适的标记探针（参见第五，七，八，十章）。用 DEPC 处理的水配制。

3. 方　　法

3.1 总 RNA 的分离

3.1.1 氯化锂-尿素法

本法可用于小量或大量新鲜的或冻存的组织，也可用于培养的细胞。它对核酸酶的抑制有效，从而可获得高质量的有生物活性的 RNA。本法根据 Auffray 和 Rougenon 的方法[4]，整个过程中不需要超速离心的步骤，只需用一台配备甩平转子、能运转标准的一次性灭菌塑料离心管（1.5～50 ml）的冷冻台式离心机。这样就不须使用特殊处理的玻璃器皿，而且本方法可以用来从许多样品中同时分离 RNA。

1）称取新鲜或冰冻组织，放入适当大小的灭菌的一次性塑料离心管中。

2）每克起始材料中加入匀浆缓冲液 5～10 ml。

3）用 Polyton，Ultra-turrax 或类似的电动匀浆器将塑料管中的样品在 0℃（冰上）匀

浆 2 min（参见注释 2）。

4）将样品置冰上超声处理 1～2 min 以彻底切断 DNA 链。当小量样品放入 1.5 ml Eppendorf 离心管中时应使用微量吸嘴。

5）用小型台式离心机于 0℃ 以低速（1000 r/min）离心 2～5min，沉淀未被匀浆的物质和细胞膜碎片。

6）上清液倾入新的离心管，置 0～4℃ 过夜（参见注释 3）。

7）DNA 应在溶液中，而 RNA 则被离心沉淀。可用 Sorvall HB4 转子于 9000 r/min 在 0℃ 离心 10 min，或用冷冻台式离心机于 2000～4000 r/min（用最大转速）在 0℃ 离心 30 min，可根据样品量大小和离心管的类型决定。

8）弃上清液，加预冷至 4℃ 的 0.1 倍体积 LiCl-尿素匀浆缓冲液，涡旋振荡后置冰上 30 min。

9）离心，弃上清液（参见注释 4）。将沉淀按每克原始组织对 5 ml 的比例溶解于 TES，或以 0.5 倍体积开始时所用的匀浆缓冲液代替 TES。样品须混匀使沉淀打碎和溶解。

10）加等体积的酚/氯仿/异戊醇（24:24:1）抽提样品，剧烈振荡 5～10 min，（参见注释 5）。

11）室温下用台式离心机 3000～4000 r/min 离心分相，小心移出上层液相置于另一新管中。如果交界面很厚，可加入 0.5 倍体积的 TES 再次抽提有机相后离心。

12）合并水相，加等体积酚/氯仿/异戊醇再次抽提。台式离心机 3000～4000 r/min 离心分相，小心吸出上层水相置于新管，重复以上抽提步骤直至界面清晰。

13）加 0.1 倍体积的 3 mol/L 醋酸钠、pH 5.2，和 2 倍体积 95% 乙醇，混合后置于 −20℃。RNA 在此阶段能长久稳定。

14）离心收集 RNA 沉淀（同步骤 7），弃上清液，用等体积的 70% 乙醇淋洗 RNA 沉淀，再离心。

15）将 RNA 溶于 TE，于 260 nm 测吸光度（40 μg/ml = 1 A_{260}U），调整溶液体积至所需浓度，贮存于 −20℃（参见注释 6 和 7）。

用此法制备的总 RNA 相当纯，可直接用于多种测定（S1，RNase 保护法和 Northern 印迹）或用于制备 poly A^+ RNA。

3.1.2 热 酚 法

本法可从组织培养的细胞中快速分离 RNA，尤其在处理大批量不同的样品时非常有用。样品中的 DNA 因为可溶于 60℃、pH 5.2 的热酚中而被除去。

1）于 50 ml 塑料管中离心沉淀细胞。重悬细胞于 PBS 后再离心沉淀。再用 PBS 洗一次。目的是除去所有培养液和血清。

2）细胞沉淀重悬于 1 ml 50 mmol/L 醋酸钠中、pH 5.2。涡旋振荡器上混合使所有细胞团块分散。

3）加 10 ml 50 mmol/L 醋酸钠、pH 5.2，内含 1% SDS。颠倒混合使细胞裂解。

4）加等体积（11 ml）酚（用 50 mmol/L 醋酸钠、pH 5.2 饱和，预热到 60℃）。涡旋

混合后放入60℃水浴15 min。在保温过程中，经常取出试管涡旋振荡数秒钟。

5）取出试管立即浸入NaCl/冰糊（-10℃）5 min。

6）在冷冻台式离心机中以3000 r/min在2℃中离心10 min。插入移液管，吸除底层酚相，保留交界层。

7）加入10 ml 60℃的饱和酚，涡旋振荡。60℃水浴保温15 min，并重复涡旋振荡。

8）取出试管，浸入NaCl/冰糊5min。2℃中3000 r/min离心10 min。

9）小心吸出上层液相，加入0.1倍体积的5 mol/L NaCl和2倍体积95%乙醇，置于-20℃。

10）用Sorval HB-4甩平转子4℃中9000 r/min离心1 min以沉淀总RNA。弃上清液，70%乙醇淋洗一遍，再次离心沉淀。

11）再次溶解RNA于TE中，分光光度计A_{260}测浓度。贮存于-20℃。

3.2 polyA$^+$ RNA的分离

polyA$^+$ RNA可在寡聚dT纤维素上用层析法进行批量分离，纤维素可以装于离心管内，也可像放射免疫测定所用的装置那样，装在灭菌的无RNase的塑料柱中。层析柱安装到架子上，可同时处理20个样品。本方法对大量或小量的总RNA都能适用，只要不超过寡聚dT的结合力。当总RNA量非常小时，可加入载体RNA以减少损失。这样就很容易从小至10～100 μg总RNA中分离出polyA$^+$ RNA[5]。本法根据Aviv和Leder[6]的方法。

1）将寡聚dT纤维素悬于水中数小时，使其充分膨胀。

2）缓和地混合纤维素，静置20 min使其沉降。将细颗粒倾滗出来，以免将柱堵塞，加入灭菌水，重悬纤维素。

3）重悬寡聚dT纤维素于0.1 mol/L NaOH中，将纤维素浆注入柱内。待液体流出直至纤维素在柱底部堆积成5～7 mm厚。

4）小心用移液管加5 ml结合缓冲液到每个柱上并令其全部流出以淋洗纤维素。重复淋洗纤维素三次除去全部痕量NaOH。洗脱液应用pH试纸测试。至此柱子即可使用（参见注释8）。

5）溶解总RNA于TES，通常用1～2 ml溶解小样品，大样品（5～10 mg RNA）则用5～10 ml，当样品非常小时（小于100 μg总RNA），加入100 μg/ml的polyA$^+$ RNA载体5 μl。

6）RNA置60℃水浴加热10 min。取出后加入0.1倍体积的6 mol/L LiCl贮存液调整盐浓度到0.6 mol/L LiCl。

7）涡旋混匀后立即将样品小心注入已制备好的寡聚dT柱内。尽可能不要搅动纤维素层。

8）收集洗脱液，重新注入柱上以确保polyA$^+$ RNA完全结合于柱上。再次收集洗脱液，作为polyA$^+$ RNA保存。

9）加5 ml结合缓冲液，小心不要搅动纤维素层，待结合缓冲液流过柱子后用5 ml结合缓冲液再重复三遍。

10）用 5 ml 低盐结合缓冲液淋洗三次可从柱上除去痕量的核糖体 RNA。
11）待柱子中液体流干，加洗脱缓冲液：
   a. 如果柱上结合的 RNA 量大时，用 1 ml 洗脱缓冲液洗脱 5～10 次，用 1.5 ml 灭菌离心管收集（参见注释 9）。通过测定各部分洗脱液的 A_{260}吸光度（洗脱缓冲液做空白）来判断哪一管含有 RNA。通常在第 3～4 管中。
   b. 如果 RNA 量小，加 75 μl 洗脱缓冲液，使全部流过柱。用 150 μl 洗脱缓冲液洗柱，重复四次，每次间隔 1～2 min 使 RNA 洗脱。将 RNA 收集到一个 1.5 ml 灭菌小离心管中。同样再用 150 μl 洗脱缓冲液洗四次，收集于另一管中。一般情况下全部 $polyA^+$ RNA 都在第一管中。
12）用 0.1 倍体积的 3 mol/L 醋酸钠（pH 5.2）和 2 倍体积的 95% 乙醇沉淀 RNA。置于 -20℃。在微型离心机上 4℃ 离心 15～20 min，或用 Sorval HB-4 转子 9000 r/min 4℃ 离心 10 min。弃上清液，用等体积的 70% 乙醇淋洗沉淀后离心。弃上清液，将 RNA 溶于 TE，置 -20℃ 保存。

3.3 凝胶电泳、转移和紫外线交联

电泳和根据毛细管作用转移核酸的方法在许多方法学书籍中有详细介绍。下面所介绍的是根据标准操作[6~8]略加修改的内容。紫外线交联方法是根据 RNA 永久结合于 Gene Screen 膜的优化试验而设计的[9]。

3.3.1 电　　泳

1）用温和的去污剂小心清洗电泳槽、成胶槽（板）和梳子。然后用洁净的蒸馏水淋洗，最后用灭菌的蒸馏水淋洗。每一步操作都须戴手套以免 RNase 的污染。
2）在通风橱中安置好电泳槽和成胶槽及梳子，因为在灌胶和成胶过程中有甲醛蒸气释放出来，刺激眼睛。
3）配 200 ml 1.4% 的胶时加 2.89 g 琼脂糖于 156 ml 灭菌的蒸馏水中。置于 500 ml 烧瓶中煮沸至琼脂糖熔化，冷却至 60℃（参见注释 10）。
4）加 10 ml 20×MOPS 贮存液和 34 ml 37% 的甲醛。缓缓旋转混合后立即灌胶。勿使胶表面形成气泡。如果已有气泡，可用灭菌的注射针头在胶冷却前刺破。
5）待胶凝固后小心取下梳子。含甲醛的胶比普通的琼脂糖胶脆，易碎，操作时宜小心。
6）RNA 样品置于 1.5 ml 离心管中与染料-变性混合液混合。混合液的成分如下：1 μl 20×MOPS，10 μl 甲酰胺，3.5 μl 37% 甲醛，2 μl 蓝染液和 5 μl 含 RNA 的 TE 溶液。通常 1～2 μg $polyA^+$ 即够。如果 RNA 过稀，可以先干燥然后重溶于 5 μl TE 中。样品可于临用前数小时或隔夜制备好，置于 4℃ 中。
7）RNA 样品置于 60℃ 水浴 10～15 min 进行热变性，然后置于冰上冷却后立即上样。
8）60～70 V 电泳 5～7 h，电泳缓冲液 1×MOPS 中不含甲醛（参见注释 11～13）。

3.3.2 转　　移

1）按胶的大小切尼龙膜。先漂于水上，然后浸入水中使完全湿润。10 min 后，浸于

2×SSC中，直至使用。

2）将胶浸泡于变性缓冲液中 20 min，轻轻摇动（参见注释 14）。

3）将胶浸于中和缓冲液中 20 min 使其中和，然后置于 2×SSC 中轻轻摇动 20 min（参见注释 15）。

4）安装印迹装置时将浸过 20×SSC 的 3 MM 滤纸铺于架在贮有 20×SSC 的槽上的玻璃板上。滤纸两端浸于槽中作为吸取 SSC 的灯芯。

5）将胶置于湿的 3 MM 滤纸上，带加样孔的一面向下，使光滑、平整的一面与尼龙膜接触。

6）在 3 MM 滤纸灯芯的暴露部分上用蜡膜（parafilm）将胶围住，以确保 20×SSC 只能通过胶流动。

7）用 20×SSC 将胶的表面湿润，小心将湿润的尼龙膜放在胶的上面。避免有气泡存在于膜与胶之间。

8）将三层切成与胶大小一致的、事先用 20×SSC 湿润的 3 MM 滤纸覆盖在膜上。小心避免气泡进入尼龙膜与滤纸之间。

9）放几英寸厚的一叠纸巾于 3 MM 滤纸上。压上一块玻璃板并加重物（如铅块）于其上，转移过夜。如纸巾完全湿透，可换新的纸巾。

10）转移完成后除去纸巾，用墨水笔标记各泳道的位置和胶在膜上的方向。

11）用解剖刀片修齐尼龙膜的边缘，将尼龙膜从胶上揭下。将尼龙膜浸于 6×SSC 中 1～2 min。

3.3.3 紫外线交联

1）将一大张 Saran Wrap 铺在工作台上，吸 2～4 ml 6×SSC 置于 Saran Wrap 中央。

2）从 6×SCC 中取出膜，小心放在 Saran 塑料薄膜上（接触胶的一面向下），避免在膜和 Saran 塑料薄膜之间出现气泡。

3）折叠周围多余的 Saran Wrap，将尼龙膜全部包住，放在玻璃板上。曾接触胶的一面必须向上。

4）将尼龙膜放在波长 254 nm、600 $\mu W/cm^2$ 的紫外线灯下（参见注释 16～20），曝光 5 min。

5）从紫外线灯下取出尼龙膜，打开 Saran Wrap，将尼龙膜放在两张 3 MM 滤纸中，80℃烘烤 60 min。

现在，尼龙膜可以用于杂交了。

3.4 滤膜杂交

目前有多种杂交缓冲液和杂交系统同样成功地用于膜杂交。本文所述方法根据 Wahal 等人的报道[10]。用尼龙膜时不管哪种方法都会有很高的背景。通常在杂交和洗膜的步骤中采用高浓度的 SDS 以改善背景。紫外线交联可防止高浓度的 SDS 将 RNA 从膜上洗脱下来，典型的 Northern 印迹最终结果见图 16.1 所示，此图还显示特殊的 RNase 洗

涤处理所起的作用。

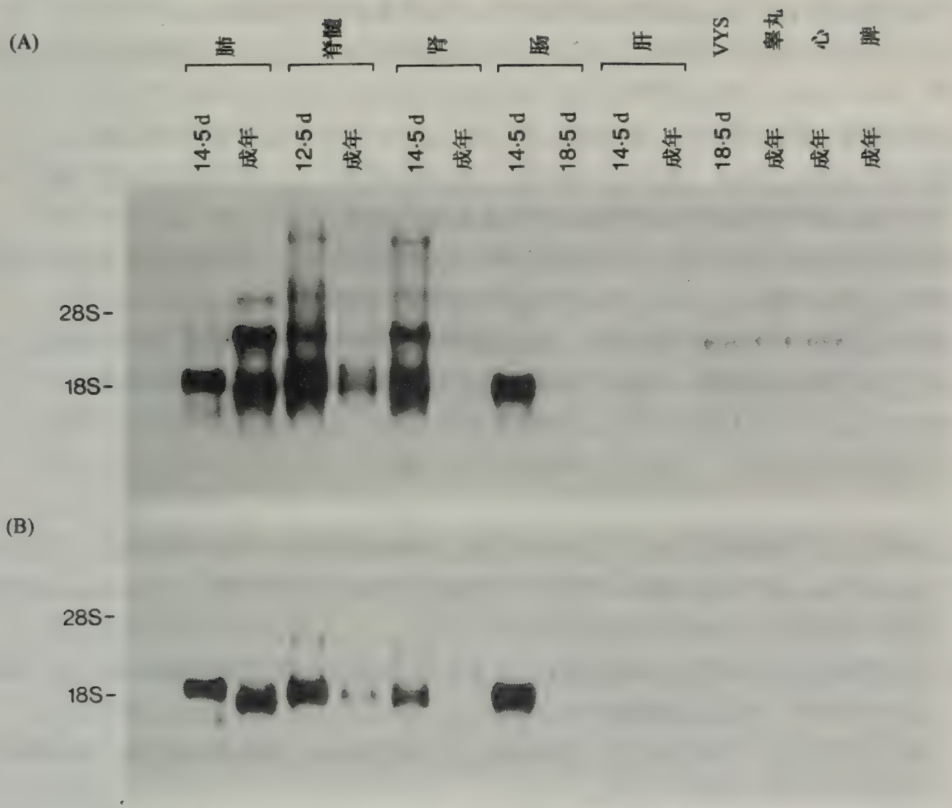


图 16.1　以同源框探针对小鼠胚胎组织进行 Northern 印迹的例子。每一泳道含有 1～2 μg polyA$^+$ RNA，RNA 来源注明在泳道的上端。(A) 用 0.1×SSC，0.5% SDS 在 80℃ 中洗涤的结果，可见略有与同源框家族中其他成员的交叉杂交痕迹。同一膜若用 RNase 处理，交叉杂交即被消除。(B) 可以看到许多条带没有改变，这些便是单个基因的转录物。但一些密切相关基因的转录物则在高严格度的处理后消失了。探针：^{32}P-单链 Hox-2.1 RNA，从一质粒模板通过 SP6 离体转录得到[1]。

1）将膜放入三面封口的塑料袋中，注入预杂交液，用封口机封住袋口。
2）将袋放入水浴中。水浴的温度应根据探针的种类而定（参见表 16.1）。探针为单链 RNA 时，温度为 60～65℃。

表 16.1　DNA 和 RNA 的杂交和洗涤条件

探针	滤膜	杂交温度/℃	杂交时甲酰胺浓度/%	洗涤条件
RNA	RNA	60～65	60	0.1×SSC，0.5%SDS，75℃
DNA	RNA	50～55	50	0.1×SSC，0.5%SDS，65℃
RNA	DNA	50～55	50	1×SSC，0.5%SDS，65℃
DNA	DNA	42	50	1×SSC，0.5%SDS，55℃

3）预杂交 2～4 h，取出袋子，剪去一角，倾出预杂交液（参见注释 21）。

4）将探针加至 10～15 ml 杂交缓冲液中，在杂交温度下预温 20 min。

5）小心将探针和杂交缓冲液注入塑料袋中并封闭袋口，封口时尽量避免气泡。杂交过夜（12～24 h）（参见注释 22）。

6）剪开袋子，倾出杂交液，取出膜。用 500 ml 2×SSC 在室温下淋洗三遍。

7）用 700 ml 0.1×SSC 和 0.5% SDS 在 70～80℃ 洗膜 1 h。更换缓冲液，重复一遍。用手持式监测器有助于检测背景。如有必要可洗第三遍。

8）从洗涤缓冲液中取出膜，在膜仍湿润时用塑料膜包封。用增感屏和 Kodak XAR-5 软片（参见注释 23～25）于 −70℃ 进行放射自显影。

9）获得结果后用 70% 甲酰胺于 80～90℃ 洗涤 10～15 min 以便将膜剥下供再用。如有必要可重复以上步骤。洗脱过的膜可作放射自显影以保证探针已被除去。

4．注　　释

（1）多种尼龙膜都曾试用过，在某种程度上一般都适用。带电荷的膜，诸如 GeneScreen Plus 或 Hybond-N$^+$，效果不是很好。根据我们的经验，GeneScreen 膜能重复获得最高 RNA 结合力和低背景。

（2）尽可能避免产生泡沫，很重要的一点是样品须彻底匀浆化以打断核 DNA。如果样品过于黏稠，可多加匀浆缓冲液。

（3）取出上清液时，要确保样品不黏稠而且不混有未匀浆化物质的凝块。进行到这一步的样品可以存放数月之久。

（4）用灭菌卷筒纸擦干管壁，尽量吸去上清液。这可以减少样品被 DNA 污染。在大样品中建议重复一次氯化锂-尿素洗涤以彻底清除 DNA。

（5）如果 RNA 沉淀溶解很慢，加入酚 / 氯仿，涡旋振荡或置于摇床上振荡直至溶解。

（6）如果测定许多样品，常用灭菌的一次性紫外小杯以减少 RNA 样品间的交叉污染并减少操作的时间。

（7）处理大样品时，DNA 有可能未被完全打断或未被氯化锂-尿素洗涤所清除。尽可能彻底地清除 DNA 很重要，因为夹杂的 DNA 使分离 polyA$^+$ RNA 所用的寡聚 dT 柱的流速大幅度降低。假如在最后的乙醇沉淀步骤之后 DNA 依然存在，可以将 RNA 重溶于 TE，并调整样品至 2 mol/L LiCl 以除去 DNA。4℃ 过夜可沉淀 RNA 而使 DNA 留在溶液中。RNA 经离心沉淀，重溶于 TE，再进行乙醇沉淀，操作同 3.1.1 节，步骤 13。

（8）如果上柱的 RNA 样品量很小（小于 100 μg），应加含酵母 tRNA 5 μg/ml 的结合缓冲液 2 ml。待缓冲液流过柱后，再用 5 ml 正常的结合缓冲液淋洗。

（9）寡聚 dT 柱经 5 ml TES 和 5 ml 0.1 mol/L NaOH 相继淋洗后可以复用。将柱置于室温下 10～15 min 以破坏残留的痕量 RNA。若要保存柱子，应先注入 TES 或 0.1 mol/L NaOH 并盖住两端柱口。该柱可置于 4℃ 长期保存，并可反复使用而不致造成以后的 RNA 损失或污染。长期保存在 NaOH 溶液中可能造成柱底玻璃纤维过滤层的一定程度的降解，如果发生这一情况，应将柱内寡聚 dT 纤维素转移

到一根新柱内。

(10) 凝胶的浓度可根据需要变动。如果所分离的 RNA 片段在 1.5～8 kb 左右，1.4% 是理想浓度。

(11) 高电压可获得最佳效果，而且缩短电泳时间。

(12) 电泳过程中缓冲液的 pH 值可能改变，因此建议在电泳进行中使用循环泵或徒手混合数次，使缓冲液得以循环流动，如果使用循环泵，就可以用更高的电压以缩短电泳时间。用 pH 试纸可以方便地监测缓冲液的 pH 值变化。

(13) 在胶上可以放上相对分子质量标准，但必须电泳后即行染色。为此可切下相对分子质量标准的泳道用于染色，用蒸馏水淋洗两次、20 min，用 0.1 mol/L 醋酸铵淋洗两次、20 min。淋洗对除去甲醛很必要，因甲醛可结合溴化乙锭。将这些切片置于 0.1 mol/L 醋酸铵（含 0.2 μg/ml 溴化乙锭）中浸润 15 min。用 0.1 mol/L 醋酸铵脱色两次各 25 min，如果背景仍然很深，可将胶置于 0.1 mol/L 醋酸铵中再脱色数小时或 4℃ 过夜，RNA 条带一般不至于扩散。在标准的紫外线透射照明装置下摄影记录。

染色能阻止 RNA 有效转移至膜，因此用于杂交的那部分胶不可以染色。$polyA^-$ RNA 中的核糖体 RNA 或商品 RNA 分子阶梯（由 Gibco-BRL 提供）都可用作相对分子质量标准。

(14) 这一步可部分降解 RNA，有助于大片段的转移，但浸泡不宜超过 20 min，如果所要转移的 RNA 片段小于 800 bp，须使用 DEPC 处理的水。

(15) 这些步骤可除去甲醛，甲醛能抑制有效的转移。

(16) 重要的是使用 254 nm 波长的灯泡，不要用偏振滤片。企图用标准的透射照明灯（通常为 305 nm）往往失败。偏振滤片一般会大大减弱有效交联所需的能量。

(17) 许多手持式紫外灯也能用，但须除去保护罩。我们建议将无偏振滤片的四个标准灯泡的透射照明装置固定于带有保护罩的盒子或箱中，使灯光自上向下照射，这样可防止紫外线照射操作人员。

(18) 光的剂量很重要。光源至样品的距离在操作方法中常有注明。但各人所用的紫外光源应测定它特定的距离 。使用标准的紫外线安全测试仪所测量单位是 $\mu W/cm^2$，波长为 254 nm。这些仪器并不昂贵，而且很容易从实验仪器供应商处购得。找出能使样品表面能量为 600 $\mu W/cm^2$ 的距离，然后将紫外灯源固定于这一高度。

(19) Stratagene 公司现在可提供紫外线交联仪（StrataLinker™）商品，按厂商的说明使用时对 GeneScreen 膜进行交联很有效。

(20) 有些作者报道用干燥的滤膜进行紫外线交联，这一方法也能成功，优点是大大减少所需时间，一般为 10～30 s。但有可能使 RNA 过度交联于膜上，从而降低了膜上有用的 RNA。对于湿的或干的膜的最适交联时间很容易直接测定。制备一个带有单一的大的加样孔的测试胶，然后转移 RNA 到膜上。将膜的大部分用黑纸覆盖，然后进行紫外线交联。设定不同的时间点，逐渐增加膜的紫外线曝光面积。这就提供了紫外线交联的时间进程。杂交之后，最适交联时间和有效交联时间范围可直接自膜上读出。有效交联时间范围在湿膜交联中往往很宽，并且实验一般有很好的可重复性。在干膜交联中，有效交联时间范围往往仅有数秒，并且难以

重复。这就是为什么我们要推荐湿膜交联的原因。

(21) 预杂交缓冲液和杂交缓冲液可事先配制，在 4℃ 中可长期保存。

(22) 以上所有转移、紫外线交联、以及杂交的方法均适用于 Southern 和 Northern 分析。只是杂交温度须根据所用核酸及探针的情况而定。表 16.1 列举分别适用于 RNA 及 DNA 的一些条件。

(23) 勿使滤膜完全干燥，干燥的膜将导致无法完全洗脱已结合的探针。

(24) 如果背景很高或由于交叉杂交而必须采用高严格度条件时，可先用 100 ml 0.1×SSC、10%～30% 甲酰胺，65℃ 洗膜 30 min，然后用 0.1×SSC、0.5% SDS，70℃ 洗膜 30 min 后再次曝光。

(25) 或者可将膜用 RNase 处理以消除高背景[1]，但有可能使膜不能重复使用。RNase 处理的步骤：将膜放在 2×SSC，0.1 μg/ml RNase A 液中，室温下放置 20 min。然后用 500 ml 2×SSC，0.5% SDS，40～50℃ 洗膜 30 min，重新显影。这一处理与 RNase 保护试验类似。图 16.1 为 RNase 处理的例子。

参 考 文 献

1. Krumlauf, R., Holland, P. W. H., McVey, J. H., and Hogan, B. L. M. (1987) Developmental and spatial patterns of expression of the mouse homeobox gene, Hox-2.1. *Development* **99,** 603–618.
2. Graham, A., Papalopulu, N., Lorimer, J., McVey, J. H., Tuddenham, E. G. D., and Krumlauf, R. (1988) Characterization of a murine homeobox gene, Hox-2.6, related to the *Drosophila deformed* gene. *Genes Dev.* **2,** 1424–1438.
3. Graham, A., Papalopulu, N., and Krumlauf, R. (1989) The murine and *Drosophila* homeobox gene complexes have common features of organization and expression. *Cell* **57,** 367–378.
4. Auffray, C. and Rougeon, F. (1980) Purification of mouse immuno:globulin heavy-chain RNAs from total myeloma tumor RNA. *Eur. J. Biochem.* **107,** 303–324.
5. Krumlauf, R., Hammer, R., Tilghman, S. M., and Brinster, R. (1985) Developmental regulation of alpha-fetoprotein in transgenic mice. *Mol. Cell Biol.* **5,** 163–168.
6. Aviv, H. and Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin mRNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69,** 1408–1412.
7. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
8. Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Mol. Biol.* **98,** 503–512.
9. Krumlauf, R. (1989) GeneScreen hybridization transfer membrane: UV-crosslinking protocols. Dupont Manufacturers Instruction Booklet, Du Pont, Wilmington, DE.
10. Wahal, G. M., Stern, M., and Stark, G. R. (1979) Efficient transfer of large DNA fragments from agarose gels to diazobenzloxymethal-paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76,** 3683–3688.

第十七章　RNA 狭缝印迹分析

David Murphy

1. 引　　言

在狭缝印迹法中，RNA 不经分离直接施放在固体支持物上，因此这一方法对分析生物在发育过程或生理变化中所出现的 RNA 数量的变化既快速又灵敏。不利之处是当样品中含有其他同源序列时不能使用，因为这些同源物也可与探针结合以至得出错误结果。

2. 材　　料

1）3∶1 上样缓冲液：5 ml 甲酰胺（Fluka [Buchs，Switzerland]；参见注释 1），1.7 ml 甲醛（Fluka），DEPC 处理过的水，0.5 ml 20 × MAE（20 × MAE：0.4 mol/L MOPS，pH 7.0，0.1 mol/L 醋酸钠，0.02 mol/L EDTA）。
2）DEPC 处理过的 20 × SSPE：3.6 mol/L 氯化钠，200 mmol/L 磷酸钠、pH 6.8，20 mmol/L EDTA。
3）与真空系统相连的狭缝印迹加样装置（如 Schleicher and Schuell Dassel，Germany）。
4）尼龙杂交支持物（如 Amersham [UK] Hybond-N）；参见注释 2。
5）紫外线交联仪：参见第十六章。
6）RNA 样品：参见注释 3～5。

3. 方法（参见注释 4）

1）加 3 倍体积的 3∶1 上样缓冲液至 RNA 样品中（RNA 可多至 50 μg 细胞总 RNA）。65℃保温 15 min 使其变性。
2）加 SSPE 至样品中，使最终浓度为 2×，最终体积达 500 μl。
3）用狭缝印迹加样装置将样品施放于尼龙膜上。
4）拆卸狭缝印迹系统，用 2×SSPE（DEPC 处理的）冲洗滤膜。
5）于 80℃烘烤膜 1 h 使膜干燥，这有助于 RNA 固定于支持物上。
6）用紫外线交联仪处理膜，使 RNA 以共价键结合于支持物上（参见第十六章）。
7）如第十六章所述进行杂交。

4. 注　　释

(1) 甲酰胺在使用前须进行去离子化处理。先将甲酰胺与混合床树脂 Dowex XG8 混合并搅拌 1 h，然后用 3 MM 滤纸过滤。若用 Fluka 甲酰胺（目录编号47 670）无须去离子处理。

(2) 这些方法曾用于中性尼龙膜（如 Amersham Hybond-N）。作者未曾试过带正电荷的膜（如 Amersham [UK] Hybond-N^+，Bio-Rad [Richmond，CA] Zeta-Probe，NEN-Du Pont [Boston，MA] Genescreen^{TM} Plus）。

(3) 使用快速制备法获得的细胞总 RNA 有可能污染有基因组 DNA，因此难以用分光光度计来精确测定 RNA 含量。此外还必须防止上样矫作物的出现。对半定量分析来说，每一样品须作两次狭缝印迹，一张膜与所要检测的 RNA 的探针杂交，另一张则与另一种 RNA 的探针杂交，这种 RNA 在各个样品中的表达都一样。或者也可以对一个样品只作一次印迹，但同一张膜须进行重复杂交。

(4) RNA 的狭缝印迹可用于快速定量测定生物发育过程中或生理变化中发生的某种 RNA 的稳态水平的变化。探针与各种稀释度的待测 RNA 样品杂交产生的信号和同一探针与各种稀释度的特定的 RNA 标准杂交产生信号相比较，这种 RNA 标准由噬菌体 RNA 聚合酶催化克隆的 cDNA 通过体外转录所产生（参见第十二章）。

(5) 众所周知，狭缝杂交很容易出现假阳性信号。这可通过以下手段尽可能地避免：

a. 用 Northern 印迹方法严格鉴定探针的特异性；

b. 在所有测试中均须有适当的阴性对照；

c. 须非常细心地制备所有探针、溶液、RNA 等以避免污染。

第十八章　RNase 保护测定法

Dominique Belin

1. 引　　言

RNase 保护检测法根据的原理是：RNA 与互补的 ^{32}P 标记的 RNA 探针在溶液中复性后形成的 RNA:RNA 杂种分子对单链专一的 RNase 具有抗性。此法可以对 RNA 分子末端进行定位或对内含子-外显子的交界定位。与 Northern 印迹相比，它是另一种十分有效而且灵敏度很高的、可用于测定 mRNA 丰度的方法。杂交过程中加入过量浓度的探针能使所有互补序列形成标记的杂种分子。未杂交的探针和已杂交的探针的单链部分则被 RNase 消化而清除 。“被保护的”探针通过变性的聚丙烯酰胺凝胶来检测并定量。当初是用 DNA 单链作为探针的[1]，但是单链 DNA 探针的制备费时。标记 RNA 非常容易（核糖核酸探针，参见第十二章），所以根据 RNA:RNA 杂交进行测定，这就十分有利了[2,3]。

RNase 保护法的优点很多。第一，溶液杂交可以处理大量 RNA（多达 60 μg 总 RNA），而不受转膜效率或与膜结合的 RNA 多少的影响。第二，信噪比明显改善，因为交叉杂交的 RNA 只产生短的保护片段。第三，相当大的一部分 mRNA 往往在分离过程中部分降解；在 Northern 印迹法中这就产生了由若干种杂交分子组成的拖尾现象，从而降低了检测的灵敏度。最后一点，在测序胶上检测杂交后的探针更为灵敏，因为条带的宽度为琼脂糖胶上的 1/10。Northern 印迹法的特点中只有两个特点是酶保护法所不具备的，即目标 RNA 的全长测定和同一样品的反复使用。

2. 材　　料

1）^{32}P 标记的探针：核糖核酸探针的制备方法见第十二章（参见注释 1～3），将探针重悬于水，浓度为 1～2 ng/μl。

2）杂交混合液：80% 去离子甲酰胺（参见注释 4），0.4 mol/L NaCl，40 mmol/L Na-PIPES、pH 6.8，1 mmol/L EDTA。

3）RNase 消化缓冲液：300 mmol/L NaCl，10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.4，4 mmol/L EDTA。

4）胰 RNase：将酶溶于含 10 mmol/L NaCl 的 TE 溶液中使其浓度为 10 mg/ml。装有 RNase 冻干粉的管子应在通风橱中小心开启以免污染，煮沸 15 min，缓慢冷却到室温。溶液分装小份于 -20℃ 贮存。

5）T1 RNase：溶于 TE 中，浓度为 1 mg/ml。调 pH 至 7.0。溶液分装小份于 -20℃ 保存。

6）蛋白酶 K：将酶溶于水，浓度为 20 mg/ml，溶液分装小份于 -20℃ 保存。

3. 方　　法

1）对每份样品，加 1 μl 探针于 29 μl 杂交混合液。探针重溶于水，为最终体积的 3%。探针的实际数量并不严格，因为探针对特定的目标片段而言是过量的（参见注释 5）。

2）冻干或用乙醇沉淀 10 μg RNA 样品，重悬于 30 μl 完全的杂交液（含探针）。90℃ 加热 2 min，然后保温过夜，一般为 45℃（参见注释 6~7）。

3）将样品置冰上冷却，加 300 μl RNase 消化缓冲液。可用胰 RNase 或 T1 RNase 或两酶共同于 25℃ 消化 1 h。胰 RNase 切割尿嘧啶或胞嘧啶后面的残基，T1 RNase 切割鸟嘌呤后面的残基（参见注释 8 和 9）。

4）加 20 μl 10% SDS，用 0.5 μl（10 μg）蛋白酶 K 于 37℃ 消化 10~20 min 除去 RNase。用酚/氯仿抽提两次。加 10 μg 载体 tRNA 后，用乙醇沉淀 RNA。

5）重悬 RNA 于样品缓冲液中。90℃ 加热 2 min 使杂种分子变性。在适当浓度的聚丙烯酰胺/尿素测序胶上电泳（参见第四十七章）。用 20% 乙醇将胶固定，用 10% 醋酸除去尿素，干后作放射自显影（参见注释 10）。

4. 注　　释

（1）探针长度应为 100~400 个核苷酸，而且其中应至少有 10 个核苷酸不和靶 RNA 互补。残存的 DNA 模板常常会产生痕量的全长的被保护探针，它们必须能与靶 RNA 所保护的片段相区别（图 18.1）。

（2）降低探针的比活往往是有用的，因为当核苷酸浓度高时，RNA 的合成增加，探针就不容易衰变，放射性物质也可少用一些 。下列准则有助于根据灵敏度的不同要求而调整探针的比活。

RNA 靶序列的丰度	未标记的 UTP	^{32}P-UTP	探针/样品[a]
高	100 μmol/L	2.5 μmol/L，10 μCi	6~12 kcpm
中	10 μmol/L	2.5 μmol/L，10 μCi	60~120 kcpm
低	—	12.5 μmol/L，50 μCi	300~600 kcpm

a 检测靶 RNA 时每一样品所需的探针量（参见注释 5）。

（3）如果要达到最高的灵敏度或做定位分析则往往须要进行纯化。对模板进行 DNase 消化后，全部样品可直接上样到 5%~6% 聚丙烯酰胺/尿素的制备型凝胶上（胶的厚度为 0.4~1.5 mm），但在样品的溶液中须有足量的 EDTA 以螯合所有的镁离子。电泳后，用塑料薄膜（Saran Wrap™）盖住湿胶，置室温曝光 0.5~5 min 对全长的转录产物定位。用刀片切去底片上已曝光的条带，将切除过条带的底片对应地放在凝胶上，用消毒过的刀片将有条带的凝胶割下来 。被割过的凝胶应再

次曝光以确定所割去的胶是否正是所需的条带部分。用电洗脱（a）或浸泡（b）的方法将凝胶上的 RNA 洗脱。

a. 在装有 0.1×Tris/硼酸盐/EDTA 溶液的灭菌透析袋中 30 V/cm 进行电洗脱 1～2 h，然后倒转电极方向电泳 30 s 使洗脱的 RNA 的从膜上脱离。洗脱液中加入已知量的 tRNA 载体（参见注释 6），然后作两次酚/氯仿抽提和乙醇沉淀。此过程对 RNase 降解十分敏感。

b. 将切下的凝胶片放在盛有 500 μl 0.5 mol/L 醋酸铵，1%SDS，以及 20 μg/ml tRNA的小离心管中，37℃保温 1～3 h。洗脱液和残留的凝胶分别通过放射记数以确定 60% 以上的 RNA 已被洗脱下来。酚/氯仿抽提两次，乙醇沉淀回收 RNA。

(4) 甲酰胺的去离子化：置于 −80℃，直至 75%～90%的液体析出结晶。弃去液相部分。融化后与混合床树脂（AG501-X8，Bio-Rad 产品［Richmond，CA］）一起

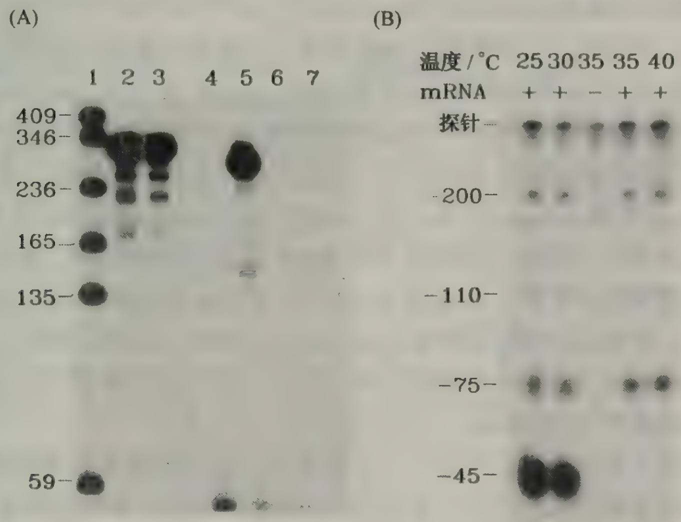


图 18.1 RNase 保护测定。(A) 靶专一信号与被残余 DNA 完全保护的探针之间的区别。从鼠的各种组织的总 RNA 中检测 PN-I mRNA[6]。探针（长度为 310 个核苷酸）用凝胶电泳纯化过。泳道 1：相对分子质量标准。泳道 2：纯化的探针。泳道 3：杂交的探针，但没有用 RNase 消化。泳道 4：用 10 μg tRNA 杂交所做的对照，仍可见痕量的完全保护的探针。泳道 5：10 μg 精囊 RNA，其中富含 PN-I mRNA；被专一性保护的片段长度为 260 个核苷酸。泳道 6：10 μg 肝脏 RNA，其中不含有可检测量的 PN-I mRNA。泳道 7：10 μg 睾丸 RNA，其中含痕量 PN-I mRNA。(B) 杂交温度对检测短的互补 RNA 链的影响。从带有 T4 噬菌体基因 *32* 表达结构的细菌取得它的总 RNA，将其中的基因 *32* 转录物的 5′端与含有基因 *32* 上游的 400 个核苷酸片段的 cRNA 探针进行杂交作定位分析[4]。所用探针未经凝胶纯化，杂交在注明的温度下进行。由于 DNase 对 DNA 模板消化不完全，可见痕量被保护的探针；在没有靶 RNA 的杂交对照组中也可见到同样的结果。被保护的 44 个核苷酸片段在高于 30℃时不被检测到。

4℃保温数小时。准备一块用聚四氟乙烯（Teflon™）包裹的磁铁。为除去磁铁上的 RNase，先用 0.1 mol/L NaOH 处理 10 min，再用水和粗制的甲酰胺淋洗。检查导电率，务使其低于 20 μS。用灭菌漏斗和滤纸（Whatman，LS-14）过滤该溶液。270 nm 的吸光度应低于 0.2。

(5) 探针的量必须超过靶 RNA 的量。由于一开始不可能知道靶 RNA 的丰度，只好根据以往的经验大致计算。注释 2 所列数据可作为参考。对于丰度非常低的靶 RNA，RNA 样品可增至 60 μg。

在 30 μl 总反应体积中加 1～2 ng 的 300 个核苷酸长度的探针可使靶 RNA 的杂交在 16 h 内完成（4～8 $T_{1/2}$）。如要缩短杂交时间，则须增加探针投入量（R_0），以获得同样的饱和度，即保持 $R_0 \times T_{1/2}$值。

(6) 每个样品须含有相同量的总 RNA 以利于 RNase 消化的进行。不足的部分可用 tRNA补足，但必须有一个只含 tRNA 的阴性对照，如图 18.1（A）第 4 泳道，图 18.1（B）第 3 泳道。

(7) 杂交温度必须降低，以便检测短的或富含 AU 碱基的被保护片段。例如，一个 44 个核苷酸长度的 T4 噬菌体基因 *32* 转录物（含 35 A/U 和 9 C/G），只有在 25～30℃中进行杂交才能被保护[4]；如图 18.1（B）。

(8) RNase 的用量取决于样品中所含的 RNA 总量，包括探针在内。本文作者通常加 0.5～1.0 μg 的胰 RNase 和/或 0.25 μg 的 T1 RNase/μg RNA。在多数情况下，单用胰 RNase 消化已足够。当探针与靶 RNA 来自不同物种时，其同源程度足以产生不连续的被保护片段，尤其是当只用 T1 RNase 消化时。消化的温度可提高到 30～37℃，尽管这样会经常导致 RNA:RNA 杂种分子的部分降解。

(9) 要保证探针在杂交过程中仍保持完整，做一个平行的对照很有帮助，即在杂交及其他处理过程中不加 RNase，如图 18.1（A），泳道 2，3。

(10) 常可检测到少量被保护的短片段，这就使对定位分析结果的解释复杂化。为区分这些片段究竟是消化所产生的矫作物，还是部分互补于探针的稀有的靶 RNA，可用一段合成的完全互补于探针的有义转录物作为靶 RNA 的对照[5]。

致　谢

感谢 P. Vassalli，是他最先鼓励我们使用核糖核苷酸探针检测稀有 mRNA。在过去的几年中，许多同事、学生、技术员都对本章所述的方法做出了贡献，他们是 M. Collart，N. Busso，J.-D. Vassalli，H. Krisch，S. Clarkson，J. Huarte，S. Strickland，P. Sappino，M. Pepper，A. Stutz，G. Moreau，D. Caput，M. Prentki，P. Gubler，F. Silva，V. Monney，D. Gay-Ducrest，和 N. Sappino。本研究由瑞士国家科学基金资助。

参 考 文 献

1. Williams, D. L., Newman, T. C., Shelnes, G. S., and Gordon, D. A. (1986) Measurements of apolipoprotein mRNA by DNA-excess solution hybridization with single-stranded probes. *Methods Enzymol.* **128,** 671–689.
2. Belin, D. (1994) The use of riboprobes for the analysis of gene expression. *Methods Mol. Biol.* **31,** 257–272.
3. Srivastava, R. A. K. and Schonfeld, G. (1994) Quantification of absolute amounts of cellular messenger RNA by RNA-excess solution hybridization. *Methods Mol. Biol.* **31,** 273–281.
4. Belin, D., Mudd, E. A., Prentki, P., Yi-Yi, Y., and Krisch, H. M. (1987) Sense and antisense transcription of bacteriophage T4 gene 32. *J. Mol. Biol.* **194,** 231–243.
5. Belin, D., Wohlwend, A., Schleuning, W.-D., Kruithof, E. K. O., and Vassalli, J.-D. (1989) Facultative polypeptide translocation allows a single mRNA to encode the secreted and cytosolic forms of plasminogen activators inhibitor 2. *EMBO J.* **8,** 3287–3294.
6. Vassalli, J.-D., Huarte, J., Bosco, D., Sappino, A.-P., Sappino, N., Velardi, A., Wohlwend, A., Erno, H., Monard, D., and Belin, D. (1993) Protease-nexin I as an androgen-dependent secretory product of the murine seminal vesicle. *EMBO J.* **12,** 1871–1878.

第十九章　mRNA的引物延伸分析

Mark W. Leonard, Roger K. Patient

1. 引　　言

引物延伸分析是一种相当快捷而方便的方法，可用它对基因转录进行监测。这一技术可用于准确地测定转录起始位置或用于定量测定帽位点专一的信息。

这一技术的基本原理见图19.1。简而言之，用放射性标记的探针（最好是单链片段）与靠近mRNA 5′端的互补序列杂交。利用逆转录酶反应将这一引物延伸返回到转录的起始点。在变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离5′端反应产物，然后放射自显影。

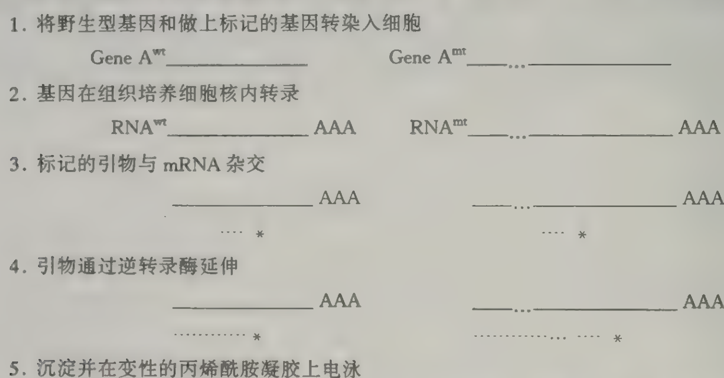


图19.1　引物延伸法示意图。用引物延伸法区别大小不同的转录物：爪蟾的野生型β-珠蛋白的基因转录物和做上标记的β-珠蛋白的基因拷贝的转录物。

引物延伸法用于mRNA分析的主要优点是方便（与S1定位或RNase定位相比）。此技术能够准确地测定转录起始位点。由于可获得非常清晰的结果，可在同一反应中定量分析数条mRNA。例如，可以区分转染的标记基因的转录产物与细胞内源性基因转录产物，或者通过精心选择引物，使被检测的基因转录产物与共转染的（内部标准）对照基因可以在同一反应中进行监测（参见图19.2）。最后，对于具有多个帽位点的基因，从每一帽位点上开始的转录产物的多少可在同一反应中分别得以检测。

以上许多设想也同样适用于S1定位或RNase定位分析（参见第十八章和第二十章）。尽管S1定位及RNase定位法往往比较灵敏，但由于引物延伸法方便，常成为RNA分析的首选方法。

2. 材　　料

如同所有涉及RNA的操作过程一样，须十分小心避免RNase的污染及样品的降

解[1]。工作台面须清洁，全过程中应戴手套。贮存液及玻璃器皿均须用 RNase 抑制剂二乙基焦碳酸盐（diethylpyrocarbonate，DEPC）处理（0.1%，37℃中 30 min 或更久）。DEPC 不可用于处理含有 Tris 的溶液，因为 DEPC 在这种溶液中不稳定。Tris 缓冲液须用 DEPC 处理的高压灭菌水配制，然后再次高压灭菌。在使用溶液之前必须清除所有残留的痕量 DEPC（用高压灭菌）以防止 RNA 和蛋白质发生羧甲基化。亦可按同样方法处理灭菌的一次性塑料器皿，但一般来讲已经基本上没有 RNase 的污染，因此不必再作这种预处理了。RNA 实验用的塑料器皿及试剂必须专用。

杂交反应用的玻璃毛细管应经硅化处理（塑料器皿不一定硅化）。须硅化处理的物品用 5% 的二氯二甲基硅烷的氯仿溶液淋洗（须在通风橱中操作，因为这种溶液有毒且具高挥发性）。硅化过的物品在用 DEPC 处理之前应用 DEPC 处理的水淋洗几次，并在 100℃ 烘烤 2 h。

单链引物的最方便的来源是化学合成的短链寡核苷酸（参见注释 1）。寡核苷酸链须 18 个核苷酸或更长些，最理想的是位于 mRNA 加帽区域中 100 个碱基的范围内，须注意所选寡核苷酸片段中不应有可使其相互之间或自身内发生杂交的重复序列，因为这将降低探针与靶 mRNA 复性的效率。

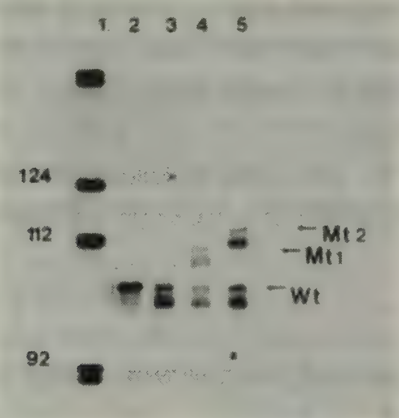


图 19.2　引物延伸反应举例：用单一的 5′端标记的寡核苷酸引物分析含有爪蟾 β-珠蛋白基因结构的培养细胞中的细胞质 RNA。泳道 3：只含有野生型的 β-珠蛋白基因；泳道 4 和 5：野生型基因，外加在该基因的第一个外显子中插入不同大小的寡核苷酸片段的基因。样品与标记的 DNA 相对分子质量标准（泳道 1）以及来自非洲爪蟾的成红细胞的 50 ng 总细胞质 RNA（泳道 2）同时电泳以表明在活体内所用的帽位点。

通常，引物用 5′端标记[2~4]（参见注释 2），尤其是当用 Maxam 和 Gilbert 方法[3,5]测定引物延伸产物的序列时。标记的引物应先除去未掺入的核苷酸（用 Sephadex G-25 柱离心），然后用 Cerenkov 记数法测定比活。引物的比活（SA）应大于 5×10^5 dpm/pmol。

1）10×激酶缓冲液：500 mmol/L Tris-HCl、pH 7.6，100 mmol/L $MgCl_2$，50 mmol/L 二硫苏糖醇（DTT），1 mmol/L 亚精胺，1 mmol/L EDTA。

2）5×杂交缓冲液：2 mol/L NaCl，50 mmol/L PIPES、pH 6.4。

3）1×延伸缓冲液：5 μl 1 mol/L Tris-HCl、pH 8.3，5 μl 200 mmol/L DTT，5 μl

120 mmol/L $MgCl_2$，2.5 μl 1 mg/ml 放线菌素 D，10 mmol/L dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 5 μl，1 μl（约 40 U）RNase 抑制剂 RNasin，用 DEPC 处理过的水加至89 μl。
4）甲酰胺上样染料：80％去离子甲酰胺，45 mmol/L Tris-HCl 硼酸盐，45 mmol/L 硼酸，1.25 mmol/L EDTA，0.02％二甲苯青。
5）G25 葡聚糖凝胶：将葡聚糖凝胶混悬于 50 倍体积的 TE 中（10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，1 mmol/L EDTA）。高压灭菌 15 min（葡聚糖凝胶将会溶胀），冷却至室温。用有盖瓶子贮存于 4℃。
6）载体（酵母）tRNA：用 DEPC 水配制 25 mg/ml。称重时宜用原装的瓶子以避免 RNase 污染。－20℃保存于灭菌塑料管内。
7）3 mol/L 醋酸钠（NaOAc），用冰醋酸调至 pH 5.4，用 DEPC 处理，然后高压灭菌 15 min。
8）70％乙醇/DEPC 水：70 ml 无水乙醇内加入 30 ml DEPC 处理过的水。

NaCl，$MgCl_2$，EDTA 和 PIPES 均须照上述方法进行 DEPC 处理。缓冲液中的其他成分则须用 DEPC 处理过的高压灭菌水配制，而不是用 DEPC 直接处理。放线菌素 D 对光敏感而且有毒，不可高压灭菌。DTT 对热不稳定，不可高压灭菌（1 mol/L 的 DTT 贮存液应用 DEPC 处理的 10 mmol/L NaOAc 配制，过滤除菌，分装后－20℃保存）。dNTPs 贮存液应过滤灭菌。

这些缓冲液分装后贮存于－20℃。如使用 RNase 抑制剂 RNasin，应在使用的当天加入延伸缓冲液中。逆转录酶（分装保存于－70℃）也同样应在临用前加入延伸混合液中。

3. 方　　法

下面介绍标记、杂交、延伸反应中所用的方法。杂交反应经常是在前述的密封的毛细管中进行。不过，用了注释 3 改进的办法后，操作步骤可大为简化。

3.1　用激酶对引物进行磷酸化

1）在塑料微型离心管中，加 1～50 pmol 寡核苷酸（5′端未磷酸化的），2 μl 10×激酶缓冲液，70 μCi ^{32}P-γ ATP（3000 Ci/mmol），10～20 U T4 多聚核苷酸激酶，DEPC 水加至 20 μl。
2）37℃保温 30 min。
3）加 4 μl 250 mmol/L EDTA。
4）通过 G25 葡聚糖凝胶柱离心除去未掺入的标记核苷酸（参见注释 4）。
5）用酚/氯仿/异戊醇（25∶24∶1）（v/v）抽提。
6）加入 10 μl tRNA（作为沉淀的载体）。
7）加 1/10 体积的 3 mol/L 醋酸钠，加 2 倍体积的 100％乙醇，离心沉淀 15 min。用 70％乙醇洗沉淀，然后真空抽干。

8）用 DEPC 水重悬 RNA（0.25～2.5 fmol/μl）。

3.2 杂交反应

1）在塑料微型离心管（不必硅化）中加入 2 μl（0.5～5 fmol）标记的引物（参见注释 5），2 μl 5×杂交缓冲液，0.1～1 fmol 目标 mRNA（总 RNA 可多至 20 μg），加 DEPC水至 10 μl。
2）将上述混合物移至硅化的玻璃毛细管中（参见注释 3）。
3）用煤气灯封住毛细管两端，在样品上标上不易擦掉的记号（如有必要可标在防水胶带上）。
4）样品浸入 70℃ 水浴加热 3 min（参见注释 6）。
5）浸入最适温度的水浴中杂交 3～6 h（参见注释 7～11）。

3.3 延伸反应

1）擦干毛细管，用切割玻璃的刀切割两端。
2）去掉毛细管两端，接上吸管，将杂交混合液转移至一装有 89 μl 延伸反应液的微型离心管内（如必要，可加 1 μl［约 40 U］RNasin，参见注释 12）。
3）加 1 μl（约 20 U）AMV 逆转录酶于每一样品管中。
4）延伸反应混合液 42℃ 保温 1 h（参见注释 13）。
5）加 11 μl 3 mol/L NaOAc，按 3.1 节步骤 7，用乙醇沉淀全部核酸，70％乙醇洗涤沉淀，真空抽干。
6）在沉淀中加 5～10 μl 甲酰胺上样染液。
7）90℃ 热变性 3 min，置冰上冷却。
8）在合适百分比的变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳，和大小合适的相对分子质量标准或 DNA 测序阶梯同时电泳。

标记的延伸产物在标准的尿素变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳（胶浓度取决于引物至 mRNA 5′端的距离），使不同帽位点的转录物得到很好的分离。这对于转录起始点的测定尤为重要，对于多起始点的基因的定量测定也同样重要（参见注释 14～16）。

4. 注　　释

（1）单链的寡核苷酸（5′端未磷酸化）是引物的最方便的来源。此外，引物也可从相应的克隆的基因通过限制酶消化而获得。利用一对相距 20～100 bp 并产生不同长度的黏性末端的稀有酶切的位点；经酶切后产生不同长度的一条编码链和一条非编码链。对两次切割位点之间的片段作放射性标记可产生一个独一无二的末端标记片段，在变性的丙烯酰胺凝胶上电泳[3]和放射自显影[6]后可以与非编码链分开。两条链的长度相差愈大，限制酶切的片段愈小，探针的分离也就愈好。也可

用一个独一无二的末端标记的双链引物，因为 RNA-DNA 杂种分子比 DNA-DNA 杂种分子更加稳定（大约高 5℃）。不过用双链引物时须要精确测定杂交温度，这就降低了这一技术的效率。

(2) 理想的情况是引物应该标记在 5′端。限制酶切片段的 5′端磷酸必须在激酶处理之前先用碱性磷酸酯酶除去[4]。应该购买不含末端磷酸基团的寡核苷酸，这样就可省略碱性磷酸酯酶处理了。采用 Maxam 和 Gilbert 方法测序时，5′端标记就特别重要。不过，如果仅仅用作对某个 mRNA 的定量测定，那么 3′端标记也是可以的[4,7]。实际上，应用限制酶所产生的探针可能更为简单一些，（例如，对于产生不同大小的链标记可能是重要的）。采用均匀标记的（M13 载体产生的）探针时引物延伸分析法的灵敏度可以得到改进[4,7]。

(3) 杂交反应经常在硅化的毛细管中进行，但这步操作也可以大大简化为直接在塑料微型离心管中进行。重要的是必须把离心管全部浸没在水浴中防止蒸发，因为蒸发可使盐浓度改变，从而影响杂交。必须注意离心管一定要封好，最好用螺帽离心管。延伸反应于是就可以在同一管中进行。

(4) G25 葡聚糖凝胶柱的制备：2 ml 灭菌塑料针筒的隆起的一端用多聚羊毛塞牢，将浓的葡聚糖糊加至针筒内，将针筒放在一只灭菌的塑料离心管内，在甩平转头上离心 5 min，转速 1500 r/min，弃去离心管及内盛的缓冲液，针筒转移到另一洁净的离心管内。将标记的引物加入到柱的顶部，用 50 μl TE 淋洗引物管，一并加到柱上，保证标记物全部上柱。1500 r/min 离心 5 min。标记的引物存在于洗脱液内，未掺入的标记物则留在柱的顶部。成功的标记探针在盖氏计数器上测试时，指针偏向满度。如果没有达到满度，则须用 50～100 μl TE 再洗柱一次。取 1 μl 探针作 Cerenkov 计数测定比活。探针比活（SA）若小于 $2\sim5\times10^6$ dpm/pmol 便不能使用。

(5) 若将标记引物与正在制备的待分析的 RNA 先行混合，可能更方便一些。引物与 RNA 于是便可以共沉淀，沉淀可悬于 DEPC 处理过的水中，杂交反应所需的其他成分便可直接加入此重新悬浮的沉淀中。

(6) 引物和待分析的 RNA 与杂交缓冲液混合，加热至 70℃ 破坏 RNA（或引物）的二级结构，然后再行复性。

(7) 杂交时引物浓度约为互补的 RNA 摩尔浓度的 10 倍，如果超过太多（特别是当杂交严格度低于最适时）可以造成非特异性的启动。

(8) 杂交的最适温度取决于引物的长度及其碱基组成。计算 RNA-DNA 杂种分子的解链温度的公式[8,9]对于短链的 DNA 引物是不精确的。大多数探针的解链温度在指定的缓冲液中为 45～65℃ 。应该用这一范围内的温度进行小规模的试验性实验，对专一的引物-mRNA 的结合定出最适杂交温度。

(9) 监测杂交效率的一个简单办法是对 RNA-引物杂种分子做一个修正的 S1 核苷酸定位实验（参见第二十章）。简单地说，就是将寡核苷酸和 RNA 在温度范围内进行杂交 3～6 h，用 S1 核酸酶消化杂种分子，然后在变性的丙烯酰胺凝胶上电泳，测定被保护的（杂交的）寡核苷酸量。产生最大量的抗 S1 核酸酶的标记引物的温度应该用作以后正式的杂交反应温度。

(10) 或许还须要对目标 mRNA 的用量优化，即通过用不同量的 RNA 制备物进行一个典型的杂交反应。这里可以用细胞质总 RNA，不过用 polyA$^+$ RNA 可以得到灵敏度更高和更清晰的结果。

(11) 杂交反应进行 3～6 h。在高温中 RNA 对热敏感（但在本实验的 pH 值条件下，这一效应减弱），因此最适杂交温度高的引物复性时间愈短愈好。

(12) 核糖核酸酶抑制剂 RNasin 可以用在延伸反应中（1 μl，约为 40 U），但在杂交反应中效果较小，因为在 70℃ 保温消除二级结构以及在高温进行的复性反应，都同样能使 RNasin 的蛋白质变性。此外，RNasin 的活性严格地依赖于最低量的 1 mmol/L二硫苏糖醇，而二硫苏糖醇在高温中也不稳定。核糖核苷-钒氧复合物 RNase 抑制剂（ribonucleoside-vanadyl complex RNase inhibitor）在某些条件下（在低浓度 [1 mmol/L] 的 dNTPs 中当抑制剂的量大于 2 mmol/L 时）可以降低延伸的效率。

(13) 延伸反应在 42℃ 进行以减少 mRNA 的二级结构的形成，后者可使逆转录过早终止。

(14) 引物离帽位点愈远，则逆转录酶在 RNA 二级结构的部位上或在 RNA 降解（例如被 RNase 降解）的部位上过早终止的可能性就愈大。这些不连续的“早熟的”带使帽位点信号减弱。如将引物的位点移到对延伸有强大阻碍作用的二级结构的 5′ 端处，可以改进帽位产物的得率。

(15) 延伸反应往往在帽位邻近处形成不止一条带（参见图 19.2 ）。这可能代表真正的转录多起始点。此外，认为如果 mRNA 的帽位上或邻接的核苷酸上发生甲基化，可使逆转录酶的作用在一部分分子中过早终止。在精确测定转录起始点时，这些影响都应加以考虑。在不同型的转染细胞中的几种帽位点条带之间的比例有所不同，但对一定来源的 mRNA 则保持恒定不变。

(16) 额外的条带可以由于逆转录酶催化的 cDNA 回折合成所造成，尽管在延伸缓冲液中已经加入的放线菌素 D 应该减弱这一活性。焦磷酸钠（80 mmol/L）似乎效果更好，但它对某些来源的逆转录酶可能有抑制作用。引物与组织培养细胞的内源性 RNA 或与载体 tRNA 之间的交叉杂交有时可以导致出现假带。从不表达该基因的细胞中分离 RNA 做引物延伸反应作为对照，就可以鉴定出这些假带。

参 考 文 献

1. Blumberg, D. (1987) Creating a ribonuclease-free environment, in *Methods in Enzymology,* vol. 152 (Berger, S. L. and Kimmel, A. R., eds.), Academic, London, New York, pp. 20–24.
2. Richardson, C. C. (1965) Phosphorylation of nucleic acid by an enzyme from T4 bacteriophage infected *E. coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54,** 158–165.
3. Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base specific chemical cleavages, in *Methods in Enzymology,* vol. 65 (Grossman, L. and Moldave, K., eds.), Academic, London, New York, pp. 499–560.

4. Arrand, J. E. (1985) Preparation of nucleic acid probes, in *Nucleic Acid Hybridization—A Practical Approach* (Hames, B. D. and Higgins, S. J.), IRL, Oxford, Washington, DC, pp. 139–160.
5. Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74,** 560–564.
6. Boffey, S. (1987) Autoradiography and fluorography, in *Techniques in Molecular Biology,* vol. 2 (Walker, J. M. and Gaastra, W., eds.), Croom and Helm, London, Sydney, pp. 288–295.
7. Tsang, A. S., Mahbubani, H., and Williams, J. G. (1982) Cell-type-specific actin mRNA populations in dictyostelium discoideum. *Cell* **31,** 375–382.
8. Schildkraut, C. and Lifson, S. (1965) Dependence of the melting temperature of DNA upon salt concentration. *Biopolymers* **3,** 195–208.
9. Britten, R. J. and Davidson, E. H. (1985) Hybridization strategy, in *Nucleic Acid Hybridization—A Practical Approach* (Hames, B. D. and Higgins, S. J., eds.), IRL, Oxford, Washington, DC, pp. 3–15.

第二十章　应用单链 DNA 探针的 S1 定位法

Stéphane Viville，Roberto Mantovani

1. 引　　言

S1 核酸酶是一种内切核酸酶，从米曲霉（*Aspergillus oryzae*）分离得到。它能降解单链核酸，但不能降解双链核酸。此外，它能降解局部错配的双链分子。灵敏度如此之高，即使只有一对碱基的错配，也能被切割而被检测出来。在实际工作中，先将末端标记的双链 DNA 探针变性，再与互补的 RNA 分子进行杂交。S1 被用来识别和切割错配或未复性的区域。切割产物在变性丙烯酰胺凝胶上电泳分析。根据 S1 核酸酶的这一性质，已有多种应用 S1 核酸酶分析 mRNA 的方法问世[1,2]。在同一实验中可以获得定性和定量的资料[3]。

定性方面，可以测定 mRNA 的起始位点，可以建立某一基因的内含子/外显子图谱(参考文献[4]和图 20.1)，以及定出 polyA 的位置。定量方面，可以用来研究基因调控，不论是用离体或是活体的实验，如研究 Eα 基因的启动子[5]。

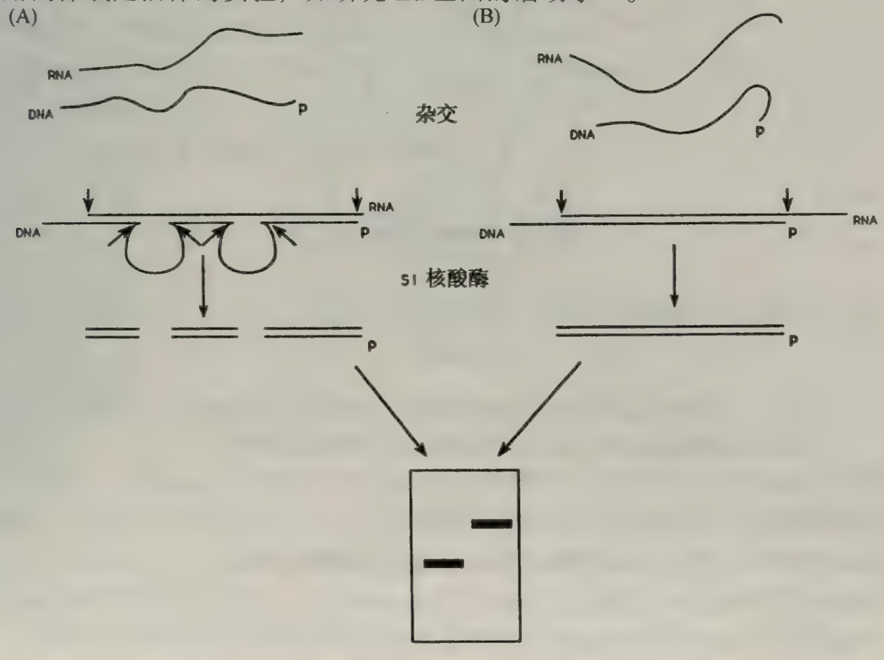


图 20.1　S1 核酸酶的应用说明。(A) 对某一基因的内含子/外显子定位。标记的 DNA 与对应的 mRNA 杂交后，内含子被 S1 核酸酶切割。(B) 对 mRNA 的 5′端定位。用标记的 DNA 作探针对 mRNA 5′端定位。以上两种情况中，标记的片段可于变性丙烯酰胺凝胶上显示。

本章叙述一种 S1 定位法，包括单链 DNA 探针的制备和运用（参见图 20.2）。这一方法具有下列优点：

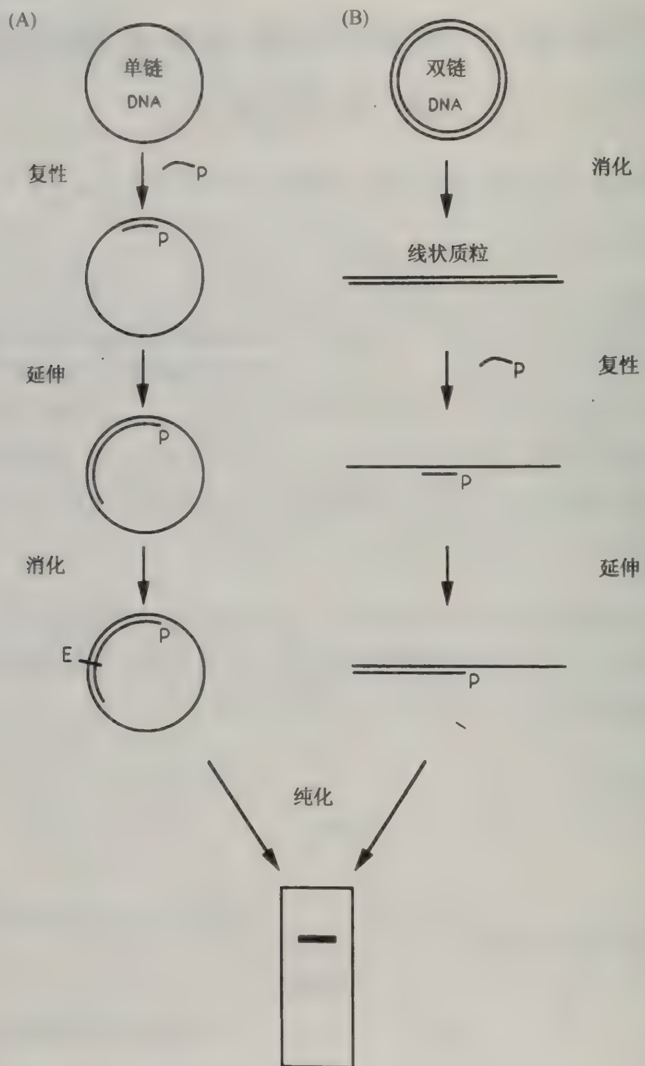


图 20.2　本章中叙述的两种用于制备单链 DNA 探针的方法示意图。(A) 以单链质粒为模板合成探针。(B) 以双链质粒 DNA 为模板合成探针。

① 寡核苷酸可以准确选择作为探针的片段。
② 寡核苷酸易于标记且效率高，可以获得高比活的探针。
③ 探针可从单链 DNA 制备（如 M13，BlueScript），也可从双链模板制备。
④ 单链探针不会发生像双链探针在制定杂交条件时经常遇到的那些问题[6]。
⑤ 探针在 3～4 周内都是稳定的。

这里用分析 Eα 启动子的过程举例说明。

2. 材　　料

2.1　用单链 DNA 模板制备单链 DNA 探针

1）10×激酶缓冲液：400 mmol/L Tris-HCl、pH 7.8，100 mmol/L $MgCl_2$，100 mmol/L β-巯基乙醇，250 μg/ml 牛血清白蛋白。贮存于－20℃。
2）[^{32}P] -γ-ATP：（比活＞3000 Ci/ mmol）。
3）合适的寡核苷酸（参见注释 1）：溶于蒸溜水，浓度为 10 pmol/μl，－20℃贮存。
4）PNK（polynucleotide kinase）：多核苷酸激酶，贮存液浓度为 10 U/μl，－20℃贮存。
5）10×复性缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，100 mmol/L $MgCl_2$，500 mmol/L NaCl，100 mmol/L DDT（二硫苏糖醇）。
6）DNA 模板：1 mg/ml（参见注释 2）。
7）10×dNTP 混合物：5 mmol/L dATP，5 mmol/L dCTP，5 mmol/L dGTP，5 mmol/L dTTP。
8）Klenow 片段：大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的大片段，浓度为 10 U/μl，－20℃贮存。
9）合适的限制性内切酶（参见注释 3）。
10）6％聚丙烯酰胺/8 mol/L 尿素溶液（溶于 0.5×TBE）及甲酰胺染料（参见第四十八章）。
11）X 射线胶片：需具有合适的灵敏度（如 Kodak XAR）。
12）洗脱缓冲液：50 mmol/L　Tris-HCl、pH 7.5，0.5 mmol/L　EDTA。
13）3 mol/L 醋酸钠，pH 7.4。
14）tRNA：10 mg/ml 贮存液，贮存于－20℃。

2.2　杂交和 S1 分析

15）4×杂交缓冲液：1.6 mol/L NaCl，40 mmol/L PIPES［哌嗪-N，N′-双（2-乙磺酸）］，pH 6.4。
16）去离子甲酰胺。
17）石蜡油。
18）S1 缓冲液：300 mmol/L NaCl，30 mmol/L 醋酸钠、pH 4.5，4.5 mmol/L 醋酸锌。
19）S1 酶：贮存液浓度为 10 U/μl，－20℃贮存。
20）S1 终止缓冲液：2.5 mol/L 醋酸铵，50 mmol/L EDTA。
21）异丙醇。

3. 方　　法

3.1 从单链 DNA 模板制备单链 DNA 探针

1) 寡核苷酸探针的标记：取 1 μl 非同位素标记的寡核苷酸，10 μl [^{32}P] -γ-ATP，2 μl 10×激酶缓冲液，6 μl dH_2O，1 μl 多核苷酸激酶混合，于 37℃ 保温 45 min 以标记寡核苷酸探针，95℃、2 min 以灭活多核苷酸激酶。
2) 加入 2 μl 单链 DNA 模板，4 μl 10×复性缓冲液，14 μl H_2O，依次在 65℃、10 min，55℃、10 min，37℃、10 min 保温。
3) 加入 4 μl dNTP 混合物，1 μl Klenow 片段，室温作用 10 min 后于 65℃、15 min 灭活 Klenow 片段。
4) 加入适量的 NaCl 或通过稀释校正混合物的浓度。加入 20 U 限制性内切酶，37 ℃ 保温 60 min（参见注释 3）。
5) 加入 2 μl tRNA 贮存液，0.1 倍体积的 3 mol/L 醋酸钠，3 倍体积的乙醇。置于干冰中 10 min，12 000 *g* 离心 15 min 沉淀样品。
6) 加入 20 μl 甲酰胺染料重悬沉淀，于 95℃ 加热 5 min。上样于 6%聚丙烯酰胺/尿素凝胶上，电泳直至溴酚蓝达到凝胶底端。
7) 凝胶用 X 射线感光片曝光 5 min，定出单链 DNA 片段的位置。切下相应的条带，置于 500 μl 洗脱缓冲液中过夜。
8) 加入 50 μl 醋酸钠，20 μg tRNA，1 ml 乙醇。置于 −20℃ 中 2 h，12 000*g* 离心 20 min。
9) 将沉淀作放射性活性计数后重悬于甲酰胺中(按10^5 cpm/μl)，贮存于 −20℃。此探针即可用于杂交和 S1 分析。

3.2 从双链 DNA 模板制备单链 DNA 探针

除下列步骤外(见图20.2B)，其余步骤均同 3.1 节。

1) 先用所选的限制性内切酶切割双链质粒（20 μg），沉淀并重悬于水中，浓度为 1 mg/ml。
2) 复性步骤（3.1 节步骤 2）须快速进行。加热灭活多核苷酸激酶后加入 2～5 μg 酶切的质粒，4 μl 10×复性缓冲液，14 μl 水。95℃ 保温 5 min，立即置于冰水中，然后按步骤 3 进行。
3) 省去限制性酶切（第 4 步）。

3.3 杂交和 S1 分析

1) 于 0.5 ml Eppendorf 管中加入 10 μl 探针(共10 000 cpm)，5 μl 4×杂交缓冲液，5 μl RNA(总 poly A^+ RNA 或离体合成的)，20 μl 石蜡油（以防止蒸发)。于 37℃ 保温

4～16 h（参见注释 4）。

2）加 200 μl S1 缓冲液（含 S1核酸酶100 U），充分混匀，置 37℃ 中 5～30 min（参见注释 5）。加入 50 μl S1 终止缓冲液终止反应，并加入 40 μg tRNA，300 μl 异丙醇。置于干冰中 15 min，12 000 *g* 离心 15 min。

3）用 80% 乙醇洗沉淀物，并晾干。将沉淀物重悬于 3 μl 甲酰胺染料中，95℃ 加热 5 min，上样于 6% 聚丙烯酰胺/尿素凝胶上，电泳至溴酚蓝达到凝胶底端，将凝胶曝光 8～48 h（参见图 20.3）。

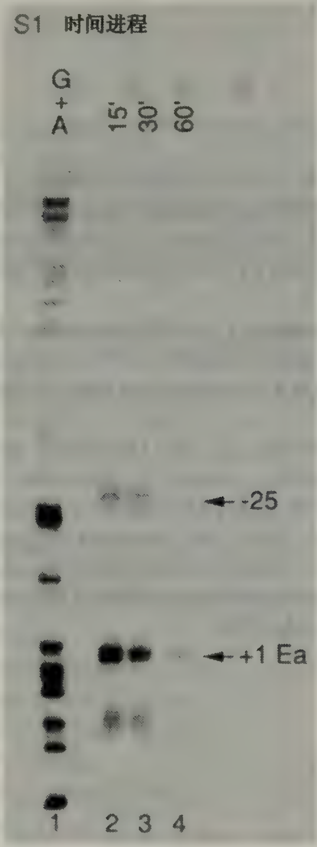


图 20.3 S1 分析的时间过程。离体合成的 RNA 与 Eα 探针杂交后置于 37℃，与 100 U 的 S1 核酸酶一起保温，时间如图中所示。

4. 注 释

（1）寡核苷酸长度应为 20～25 个核苷酸，并应与所分析的 DNA 互补。

（2）单链或双链 DNA 模板均按标准方法制备。与从双链 DNA 模板制备探针相比，用单链 DNA 模板制备探针的优点主要是探针的得率更高，用单链模板制备时比活可达 $1\times10^6\sim1.5\times10^6$ cpm，而用双链模板的预期值为 $4\times10^6\sim6\times10^5$ cpm。

（3）为提高片段的回收率，限制性内切酶应于寡核苷酸杂交处 3′端 200～600 个核苷酸

的位置上进行酶切，更长的片段难于从丙聚酰胺胶中回收。如果所用的限制性内切酶切割 DNA 模板不止一个位点，只要它们位于探针序列以外，就没有妨碍。

(4) 所分析的 RNA 种类不同，杂交时间亦不同。若用细胞质总 RNA 或 polyA$^+$ RNA，样品应于 37℃ 至少杂交 12 h；而用离体转录的 RNA 则杂交 2～4 h 已足够。

(5) 分析离体转录的 RNA 时，S1 核酸酶作用时间选择须按图 20.3 中一样进行，这样可以决定将所有的单链核酸，包括游离的探针，均被完全消化所需的条件。分析细胞质总 RNA 或 poly A$^+$ RNA 时，S1 核酸酶的最佳消化时间为 30 min，往往比消化离体转录的 RNA 所需的时间(15 min)要长一些。

参 考 文 献

1. Berk, A. J. and Sharp, P. A. (1977) Sizing and mapping of early adenovirus mRNAs by gel electrophoresis of S1 endonuclease digested hybrids. *Cell* **12,** 721–732.
2. Favaloro, J., Treisman, R., and Kamen, R. (1980) Transcription maps of polyoma virus-specific RNA: analysis by two-dimensional nuclease S1 gel mapping. *Meth. Enzymol.* **65,** 718–749.
3. Weaver, R. F. and Weissmann, C. (1979) Mapping of RNA by a modification of Berk-Sharp procedure: the 5' termini of 15 S β-globin mRNA precursor and mature 10 S b-globin mRNA have identical map coordinates. *Nucleic Acids Res.* **7,** 1175–1193.
4. Lopata, M. A., Sollner-Webb, B., and Cleveland, D. W. (1985) Surprising S1-resistant trimolecular hybrids: potential complication in interpretation of S1 mapping analysis. *Mol. Cell. Biol.* **5,** 2842–2846.
5. Viville, S., Jongeneel, V., Koch, W., Mantovani, R., Benoist, C., and Mathis, D. (1991) The Eα promoter: a linker-scanning analysis. *J. Immunol.* **146,** 3211–3217.
6. Dean, M. (1987) Determining the hybridization temperature for S1 nuclease mapping. *Nucleic Acids Res.* **15,** 6754.

第二十一章 细胞及组织的非放射性原位杂交

Ian Durrant

1. 引　　言

原位杂交(in situ hybridization, ISH)是一项广泛应用的技术。它在许多方面都十分有用，如用于诊断病毒感染[1]、染色体分析[2]及 mRNA 分析[3]。研究人员传统上使用放射性物质制备用于 ISH 的探针[4]。这些探针可以是标记的 DNA、RNA 或寡核苷酸。RNA 及寡核苷酸探针是最为常用的，因为用于 ISH 时具有许多优点（参见表 21.1)。

表 21.1　用于原位杂交的各类探针的特点

探针类型	优　点	缺　点
RNA 探针	RNA 杂种分子很稳定	须进行亚克隆
	单链	可能被 RNase 降解
	不含载体序列	杂交条件严格
	对照容易设置	
	低本底	
	灵敏度高	
寡核苷酸探针	单链	标记水平低
	特异性高	须优化序列
	易接近靶序列	可能需要多种探针混合
	稳定	
	易于大量制备	
DNA 探针	不须亚克隆	探针须变性
	标记方法容易、可靠	杂交反应中探针再次复性
	杂交条件较不严格	难以除去载体序列

特别是由于这些探针都是单链，可提供更高的灵敏度(RNA)和更高的特异性(寡核苷酸)。近来，非放射性探针愈来愈常用，它们亦具有同样的特点。这一章中，通过用 RNA 探针检测组织切片中 mRNA 为例，来说明 ISH 的过程，但这一系统同样可用于细胞株或用于 DNA 的检测。此外，这里所叙述的原位检测方案对 RNA、DNA 或寡核苷酸探针均可应用。用于分析染色体和细胞核的操作步骤显然不同于应用非放射性 DNA 探针或荧光检测[5]。

1.1　探 针 标 记

用非放射性物质标记核酸探针由来已久，非放射性物质主要有生物素[6]和地高

辛[7]，它们通过一个间隔臂连接到 dUTP 或 UTP 的碱基上。不过，杂交本底可能较高，尤其当用生物素标记的探针时，由于许多生物体内存在高水平的内源性生物素和生物素结合位点。近年来所采用的荧光素是另一种标记物[8]。生物体内不含这一化合物，并且它能高效地掺入到核酸探针中，同时又可得到高度特异性、高亲和力的抗体，所以 ISH 的本底较低。

各种类型的探针制备如下：

① DNA 探针：通过随机引物标记法掺入荧光素标记的 dUTP 制备 DNA 探针。这一反应在第八章中已有详细叙述。荧光素标记的 dUTP 亦可通过切口平移法[9]和 PCR 反应掺入 DNA 探针[10]。

② 寡核苷酸探针：于寡核苷酸 3′端加上一段由荧光素标记的 dUTP 短尾便成探针。这一反应在第十一章中已有详述，或可参阅文献[11]。反应产生的短尾可使探针具有较高的灵敏度而又不影响杂交的严格性。

③ RNA 探针：通过使用 RNA 聚合酶和含有对此聚合酶专一性的启动子构建成的质粒（或其他合适的载体）来制备 RNA 探针。这一质粒作为模板，以双链的形式供应，聚合酶仅能对其中的一条链进行转录而产生单链 RNA（图 21.1）。如果使用的质粒在克隆的模板序列的两条链上均带有启动子，由此产生的反义链探针可与 mRNA 杂交，而有义链探针不应显示杂交信号，故可作为对照，从而证明杂交过程的专一性。

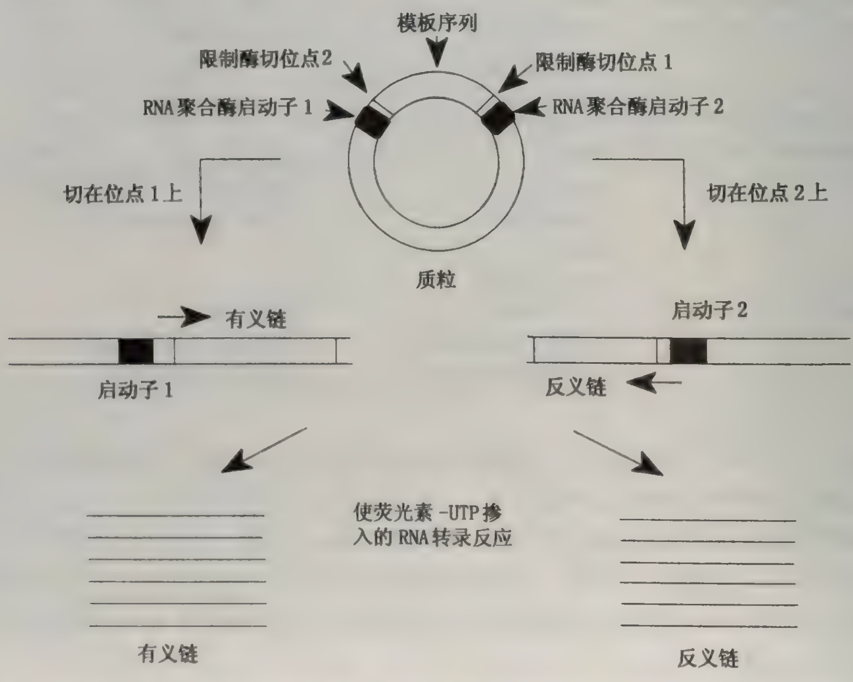


图 21.1 RNA 转录探针标记反应示意图。通过使用带有双启动子的载体产生有义链探针（阴性）和反义链探针(阳性)。

有三种常用的 RNA 聚合酶，它们分别从噬菌体 T3、T7 和 SP6 中分离得来[12]。三种 RNA 聚合酶的启动子序列都彼此不同，从而使每一种酶的转录反应具有专一性。整个标记反应简单易行、可靠，惟一须注意的是使反应混合物与外源 RNase 的接触减少到最低程度。建议使用灭菌的吸嘴、反应管和溶液，并戴防护手套。

这一标记反应最初用于放射性标记探针的标记，现已被采用于非放射性标记探针的制备。修改后的反应是很高效的，可使荧光标记的核苷酸掺入率及探针的得率均有明显的提高（见表 21.2)。

表 21.2　用不同的聚合酶制备荧光素标记的 RNA 探针的得率

载体/转录物	片段大小/kb	得　率/μg，聚合酶来自		
		SP6	T7	T3
pAM19/-	3.5	4.5		
pAM19/lysozyme	0.27	4.5	2.5	
pAM18/Nras	0.5	3.7	1.2	
pSP65/Nras	1.5	3.0		
pAM18/Actin	1.8		1.8	
pSP64/POMC	1.4	4.0		
pSP65/POMC	1.4	4.0		
pGEM/-	4.0	4.5	2.7	6.2
平均得率		3.9	2.1	6.2

1.2　原位杂交

与进行膜杂交相比，原位杂交在技术上并无多大的不同。用于膜杂交的动力学及理论[13]均适用于 ISH。ISH 与膜杂交最大的不同之处在于进行杂交之前对样品的制备过程及预处理有一些特殊的要求[14,15]。每一杂交系统中，各种条件均须优化，因为处理的成败取决于固定、固定剂、组织类型、探针类型、甚至标记物(放射性的或非放射性的)。为使 ISH 顺利进行，所花的时间是值得的，对非放射性方法可能尤其重要。虽然应用非放射性系统一般也能得到较好的分离效果，但毕竟非放射性 ISH 的灵敏度无法与放射性 ISH 相比。另外，从总体上讲，非放射性 ISH 可能更为娇嫩，所有的步骤似乎都需要精确的优化和准确的操作。ISH 的灵敏度取决于这样一些因素，包括固定、预处理、探针的标记、检测以及杂交。以上几点，随同这些系统中预杂交的优化、有效的标记、高亲和力、专一性的抗体检测等条件的优化以及通过一个杂交缓冲液的设计而体现。

2. 材　　料

DNA 探针及寡核苷酸探针的标记另有叙述。以下介绍的标记方法用于荧光素标记的 RNA 探针的制备。其他有关步骤如样品的处理、对照的设定、杂交及信号的检测，同样适用于三种类型探针。在 ISH 实验中以及后续的检测中，用荧光素标记的核苷酸

对 DNA、RNA 或寡核苷酸进行标记时，所需的各种试剂 Amersham 公司都以试剂盒的形式整套供应，如 DNA、RNA 以及寡聚染色盒（目录编号分别为 RPN3200，3300，3400。Amersham International，Amersham，UK）[16,17]。

2.1 探针标记

1）转录缓冲液：200 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，30 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L 亚精胺，0.5%(w/v)BSA(牛血清白蛋白)。
2）人胎盘核糖核酸酶抑制剂(human placental ribonuclease inhibitor, HPRI)：20 U/μl。
3）0.2 mmol/L DTT：新鲜配制，过滤除菌。
4）线性 DNA 模板：通常 0.5～1 μg/μl。
5）SP6、T7 或 T3 RNA 聚合酶都可购得，如 Amersham International(Amersham, UK)有售。
6）核苷酸溶液：1.25 mmol/L ATP，1.25 mmol/L GTP，1.25 mmol/L CTP，0.312 mmol/L UTP，0.312 mmol/L 荧光素－11－UTP（可从 Amersham 购得）。溶于灭菌水(参见注释1)。

2.2 探针标记后的纯化和加工

1）无 RNase 的 DNase Ⅰ：（Amersham E2210）用灭菌水新鲜配制，稀释至 10 U/80μL。
2）0.4 mol/L $NaHCO_3$，高压灭菌。
3）0.6 mol/L Na_2CO_3，高压灭菌。
4）冰醋酸。
5）3 mol/L 醋酸钠、pH 5.2，高压灭菌。
6）10 mg/ml 酵母 tRNA：例如 Sigma(St. Louis, MO)R8759。

2.3 杂交与严格洗涤

1）杂交缓冲液：可用标准杂交缓冲液(参见注释2)。这里推荐一种优化缓冲液成品，可从 Amersham 购得。缓冲液由以下成分组成：4×SSC，600 μg/ml 鲱鱼睾丸 DNA，2×Denhardt氏溶液。此杂交缓冲液还含有一种用于提高杂交效率的专利化合物。在使用前，这一缓冲液须用去离子甲酰胺按 1:1 稀释，稀释后的溶液可贮存于－20℃。
2）20×SSC 贮存液：3 mol/L NaCl，0.3 mol/L 柠檬酸三钠、pH 7.0。
3）10%(w/v)SDS。

2.4 封闭、抗体保温和洗涤

1）TBS：100 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，400 mmol/L NaCl。
2）封闭缓冲液：0.5%(w/v)封闭剂(RPN3023. Amersham International)，溶于 TBS。

3）抗荧光素-碱性磷酸酯酶结合物：可从 Amersham 购得。

2.5 检　测

1）检测缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl、pH 9.5，100 mmol/L NaCl，10 mmol/L $MgCl_2$。
2）NBT 溶液：50 mg/ml 硝基兰四唑(nitroblue tetrazolium, NBT)溶于二甲基甲酰胺。
3）BCIP 溶液：75 mg/ml 溴-氯-吲哚磷酸(bromo-chloro-indolyl phosphate, BCIP)溶于 70%（v/v）二甲基甲酰胺。

3. 方　法

3.1 探针标记

1）室温下于 1.5 ml 微量离心管中依次加入下列试剂（参见注释 3）：4 μl 转录缓冲液，1 μl 0.2 mol/L DTT，20 U HPRI，8 μl 核苷酸溶液，1 μg 线性 DNA 模板，25 U RNA 聚合酶，加水使终体积为 20 μl。上下反复吸放，轻轻混匀。
2）至少保温 2 h。不同的 RNA 聚合酶的保温温度不同，SP6 为 40 ℃，T3 和 T7 均为 37℃。
3）标记的 RNA 探针可贮存于－20℃（参见注释 4）。

3.2 标记探针的纯化及加工

1）于 RNA 探针混合液中加入 10 U 无 RNase 的 DNase I（参见注释5），37℃保温 10 min。
2）加入 20 μl 0.4 mol/L $NaHCO_3$，20 μl 0.6 mol/L Na_2CO_3，60 μl 灭菌水。轻轻混匀，于 60℃保温进行碱水解。保温时间依转录物的长度及所需探针的大小而定（参见注释 6）。
3）加入 1.3 μl 冰醋酸，20 μl 3 mol/L 醋酸钠、pH 5.2，2 μl 10 mg/ml 酵母 tRNA，500 μl乙醇。于－20℃至少放置 2 h 以沉淀 RNA。
4）于微型离心机上用最高速度离心 15 min 沉淀 RNA。弃上清液。
5）用 70%乙醇淋洗沉淀，保持－20℃离心 5 min，弃上清液。
6）用灭菌水溶解 RNA 探针，并调整 RNA 探针浓度为杂交所需浓度的 10～20 倍。于－20℃保存。

3.3 组织及细胞的预处理

对于任何 ISH 实验，为取得成功的结果，此步最为重要(参见注释7)。每一个杂交系统，均需要它自己的最佳预处理方案。预处理的设计根据这样一个原则：使探针与抗体的结合物便于接触到靶分子，又能使组织保持原有的形态结构，并使靶分子保持它原

有的位置。另外，预处理方案还可用于设置 ISH 所必需的一些对照实验(参见注8和图21.2)。

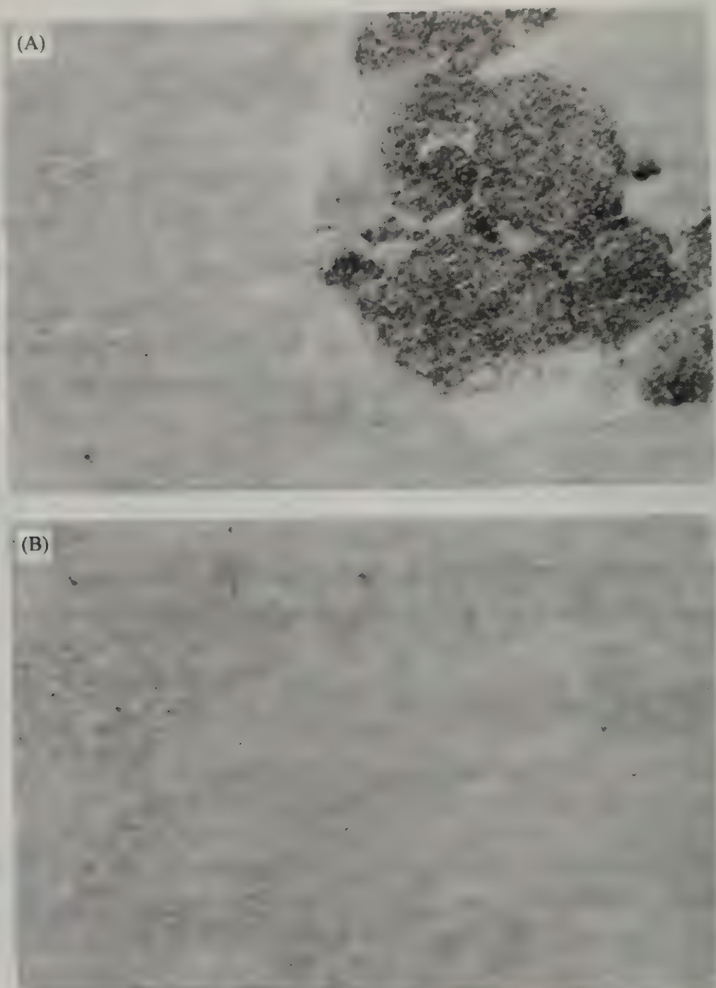


图 21.2 大鼠垂体中的鸦片样肽-促黑激素-促皮质激素原 mRNA 的原位杂交检测。冰冻新鲜的大鼠垂体用冰冻切片机切片后置于 VectaBond（Vector Labs）包被的玻片上。探针标记、杂交和检测方法已于正文中详述。(A) 用反义链探针进行杂交。(B) 用有义链探针进行杂交。

3.4 杂交和严格性洗涤

杂交的严格性的控制可通过杂交步骤中的温度、盐浓度和甲酰胺的浓度来控制。但是更方便的控制是将这些参数应用到杂交后的严格洗涤上。

1）杂交缓冲液于 37℃ 预热 5 min，按 1∶1 比例用去离子甲酰胺稀释，充分混匀。

2）于杂交缓冲液中加入所需量经 55℃ 预热的探针。300～600 ng/ml 的探针浓度适用于

大多数杂交(参见注释9)。

3) 用适当体积的杂交缓冲液/探针混合物覆盖切片（参见注释 10)。

4) 将切片放在 95℃的电热板上，放置 3～6 min。保温时间取决于靶的类型（参见注释 11)。

5) 置切片于湿润的盒中，按所需温度(典型的是55℃)及时间进行杂交（参见注释 12)。

6) 按所需的严格程度洗涤玻片。典型的洗涤程序包括：1×SSC、0.1%（v/v）SDS 于室温洗两次，每次 5 min；0.2×SSC、0.1%（v/v）SDS 于 55℃洗两次，每次 10 min。

7) 为降低本底，可用 RNase A 对 RNA 探针进一步处理。此步仅仅除去未杂交的单链探针。具体步骤如下：玻片于 2×SSC 中淋洗 2 min 后，于预热的 2×SSC 液（含 RNase A 10 μg/ml）37℃保温 20～30 min。在进行下一步骤之前，于 2×SSC 中淋洗玻片。

3.5 封闭、抗体保温和洗涤

在以下一系列保温中均须轻轻晃动玻片，除非特殊声明，均于室温下进行。注意：此处所用的 TBS 比标准 TBS 所含的盐浓度更高。

1) 玻片于 TBS 中洗 5 min。

2) 置玻片于封闭溶液（0.5%［w/v]，封闭剂溶于 TBS）中保温 1 h。

3) 于 TBS 中淋洗玻片 1 min，沥干玻片上的缓冲液，如有必要，吸干每张玻片表面切片周围的液体。

4) 按 1∶1000 比例，用含 0.5%（w/v）BSA 组分 V 的 TBS 稀释抗体（参见注释 14)。用抗体溶液覆盖玻片（每张玻片通常用 100 μl)，静置保温 1 h。

5) 玻片于 TBS 中洗三次，每次 5 min。

3.6 检　　测

1) 玻片于检测缓冲液中洗 5 min，沥干每一张玻片上的液体，如有必要，吸干玻片表面切片周围的液体（参见注释 15)。

2) 取 45 μl NBT 贮存液和 35 μl BCIP 贮存液加至 10 ml 检测缓冲液中。每张切片加 500 μl检测试剂，置于暗处显色 4～24 h（参见注释 16)。

3) 用蒸馏水淋洗玻片两次，每次 2 min。

4) 如需要，进行复染。加上封片剂，并盖上盖玻片（参见注释 17)。

5) 于光学显微镜下观察结果（参见注释 18)。

4. 注　　释

(1) 亦可用半抗原标记的核苷酸，如生物素－UTP(Sigma B8280)、地高辛－UTP (Boehringer 1209 256)。反应混合物中 CTP、GTP、ATP 的终浓度为 0.5～

1 mmol/L。标记及未标记的 UTP 总的终浓度应为 0.25～1 mmol/L。根据标记物的不同，优化反应体系中各种核苷酸的比例可能提高 RNA 探针的得率。

(2) Amersham 提供的杂交缓冲液是 2× 的贮存液，须用去离子甲酰胺按 1:1 的比例稀释。杂交缓冲液的工作溶液的标准配方应包括下列成分的最佳组合[18]：2～4×SSC、1～5×Denhardt 氏溶液、非特异性 DNA、非特异性 RNA、25%～50%去离子甲酰胺、5%～10%硫酸葡聚糖。

(3) 为防止反应缓冲液中的亚精胺使模板 DNA 发生沉淀，标记反应在室温进行。

(4) 用非放射性标记物标记探针时，通常难以监测探针的得率。若用荧光素作为标记物时，根据荧光素的特性[19]，仍有可能设计一简便而快速的方法指示探针已经开始合成并估算其产率（参见第九章）。这一试验应从体外转录混合物中取出的一小部分上进行。转录物的进一步加工，尤其是碱消化可能减少标记物的荧光性，但这并不影响其抗原性。这一点是很重要的，因为检测系统是根据对于抗荧光素抗体的识别。

(5) 当使用荧光素标记的 RNA 探针时，只要转录物大小对原位杂交已经合适，就没有必要对探针进一步纯化。在这一杂交系统中，未掺入的核苷酸对本底并无任何重要的影响。但是通过酶切去除模板 DNA 对杂交仍然有利。如果不须做碱水解，那么在此步骤后，探针可用乙醇沉淀。

(6) 如果须要碱水解，荧光标记物的存在并不干扰碱水解。经碱水解后大部分未掺入的核苷酸亦被清除，但这并不是碱水解的主要目的。初级转录产物的有限碱水解所需时间按以下公式计算[20]：

$$t\ (\text{min}) = (L_o - L_f)\ /\ (kL_oL_f)$$

式中：L_o= 初级转录物长度（kb）；

L_f= 所需探针平均长度（kb）；

k（速度常数）=0.11 次切割/kb/min。

ISH 探针的最适长度为 200～400 bp。

(7) 杂交前标本必须进行预处理[21]，包括玻片涂层、标本的制备及固定。通常有以下几个步骤：

a. 快速固定或快速冰冻生物标本。

b. 将组织切片置于涂层的玻片上。

c. 标本预处理包括联合使用酸、去污剂及蛋白酶与标本一起保温。尤以蛋白酶 K 的处理最为重要，蛋白酶 K 的浓度和保温时间须按经验优化，且不同组织可能需要不同的处理条件。细胞可能根本不须任何处理。

d. 进行处理以除去内源性碱性磷酸酯酶活性。

(8) 在 ISH 的主要反应进行时，必须同时进行一些阴性对照[22]。阴性对照可有多种形式，例如：

a. 保温时仅用杂交缓冲液(不含探针)，以评估来自杂交液中各种组分及抗体的非特异性结合所产生信号的水平。

b. 杂交前分别用 DNase 或 RNase 处理玻片以降解靶 DNA 或 RNA，从而表明探针是与期望的靶序列结合。

c. 用绝对非特异性探针进行杂交，表明所用的条件的严格程度足以除去非特异性的探针。

d. 对于 RNA 探针，标记的转录物有两种类型：与靶 mRNA 序列相同或互补的探针。用前者进行杂交应该显示所用条件的严格程度足以除去与专一性的互补链具有相同长度和相同 GC 含量的探针。

e. 如有疑问，探针可用 Northern 印迹进一步证实。

(9) 杂交时间与探针浓度有关。如探针浓度高(600～1000 ng/ml)，杂交时间可短些；如探针浓度低（200～400 ng/ml)，则须杂交过夜。

(10) 杂交缓冲液的用量视切片大小以及是否用盖玻片而定。对于小切片，不用盖玻片时加 25～50 μl 杂交缓冲液便能轻易覆盖切片。如用盖玻片，10 μl 杂交缓冲液可能足够覆盖切片。

(11) 如靶序列为 DNA，切片须置于电热板上 95℃ 变性 5～6 min。若靶序列为 RNA，尽管这一步并不严格要求，却也可取。建议标本于 95℃ 变性 3～4 min 以消除靶 mRNA 的二级结构，从而提高杂交效率。

(12) 在整个杂交过程中，为避免杂交缓冲液蒸发，保持湿度的盒子须密封好以保持高湿度。这样，玻片上的盖玻片或许可以不必密封，甚至可以完全不用盖玻片。目前，大多数的实验都置于温箱内的密封盒中进行。近来，用智能加热块技术设计的一些装置可以满足这一需要（如 OmniSlide^{TM} Hybaid)。典型的杂交反应通常须进行过夜。不过，如果探针浓度及靶序列丰度均较高时，杂交反应可只进行 2～4 h。

(13) 避免切片周围残留过多的缓冲液，这很重要，因这可能使抗体的浓度过度稀释。

(14) 在大多数的应用中，1∶1000 的抗体连接物稀释度已合适。加到切片上的稀释的抗体的体积须随着切片大小及是否使用盖玻片而改变。至于如何改变则须凭经验决定。

(15) 避免切片周围残留过多的缓冲液，这很重要，因为这可能使底物过于稀释。

(16) 检测试剂必须完全覆盖整块切片。获得结果所需的保温时间取决于靶序列的量。但为达到最高的灵敏度，通常须保温过夜。亦可用碱性磷酸酶的其他底物，如固红(Fast Red)[1)]。不过在作者的实验室中用 NBT/BCIP 系统可产生最好的信噪比。

(17) 在封片前，可进行组织化学复染使组织切片造成反差。但必须注意的是，复染不可影响已沉积于玻片上的显色反应产物。用 NBT/BCIP 作为底物时，可选择浅绿色染料复染，例如 0.5%（w/v）的甲基绿或 0.5%（w/v）固绿（Fast green）水溶液中染色 1 min。有多种标准的封片液适合于这一系统。水溶性封片剂包括 PBS/甘油(CitiFlour)及甘油/明胶(Sigma)，但这些封片剂不能与复染一起应用，因为复染的颜色会褪掉，时间长了 NBT/BCIP 显色产物也渐渐消褪。非水溶性封片剂包括 DPX(BDH/Merck)和 Histotech(Serotec)。用非水溶性封片剂封片前，非常重要的是，须确保标本已用乙醇进行梯度脱水处理，最后一次脱水用 100% 乙醇，而且在使用非水溶性封闭片剂前玻片必须凉干，若切片内有水存在颜色会随

1）固红是染料，不能单独用作酶的底物。想必原文有笔误。——译者注

时间而消退。Histotech 封片剂因烤入切片，故不须盖玻片。

(18) 建议用一台高质量光学显微镜，配备透射的白色光源和 10×、40×的两个接物镜。作者的实验室中所用的显微镜上还装有 35 mm 相机和柯达 Ektar™25 彩卷，可供摄下结果。

参 考 文 献

1. McQuaid, S., Allan, G. M., Taylor, M. J., Todd, D., Smith, J., Cosby, S. L., and Allen, I. V. (1991) Comparison of reporter molecules for viral in situ hybridization. *J. Virol. Methods* **31**, 1–10.
2. Price, C. M. (1993) Fluorescence in situ hybridization. *Blood Rev.* **7**, 127–134.
3. Mitchell, V., Gambiez, A., and Beauvillain, J. C. (1993) Fine structural localization of proenkephalin mRNAs in the hypothalamic magnocellular dorsal nucleus of the guinea pig: a comparison of radioisotopic and enzymatic in situ hybridization methods at the light- and electron-microscope levels. *Cell Tissue Res.* **274**, 219–228.
4. Brady, M. A. W. and Finlan, M. F. (1990) Radioactive labels: autoradiography and choice of emulsions for in situ hybridization, in *In Situ Hybridization: Principles and Practice* (Polak, J. M. and McGee, J. O.'D., eds.), Oxford University Press, Oxford, pp. 31–57.
5. Viegas-Pequignot, E. (1992) In situ hybridization to chromosomes with biotinylated probes, in *In Situ Hybridization: A Practical Approach* (Wilkinson, D. G., ed.), IRL, Oxford, pp. 137–158.
6. Langer, P. R., Waldrop, A. A., and Ward, D. C. (1981) Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**, 6633–6637.
7. Holtke, H.-J. and Kessler, C. (1990) Non-radioactive labeling of RNA transcripts in vitro with the hapten digoxigenin (DIG): hybridization and ELISA-based detection. *Nucleic Acids Res.* **18**, 5843–5851.
8. Cunningham, M. W. (1991) Nucleic acid detection with light. *Life Sci.* **6**, 1–5.
9. Wiegant, J., Wiesmeijer, C. C., Hoovers, J. M. N., Schuuring, E., d'Azzo, A., Vrolijk, J., Tanke, H. J., and Raap, A. K. (1993) Multiple and sensitive fluorescence in situ hybridization with rhodamine-, fluorescein-, and coumarin-labeled DNAs. *Cytogenet. Cell Genet.,* **63**, 73–76.
10. Harvey, B. and Ellis, P. (1992) Nonradioactive labelling of DNA probes during PCR. *Life Sci.* **9**, 3,4.
11. Chadwick, P. M. E. and Durrant, I. (1994) Labeling of oligonucleotides with fluorescein, in *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes* (Isaac, P. G., ed.), Humana, Totowa, NJ, pp. 101–105.
12. Melton, D., Kreig, P. A., Rebagliati, M. R., Maniatis, T., Zinn, K., and Green, M. R. (1984) Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucleic Acids Res.* **12**, 7035–7056.
13. Keller, G. H. and Manak, M. M. (1989) Molecular hybridization technology, in *DNA Probes*, Stockton, New York, pp. 1–27.
14. Wilkinson, D. G. (1992) The theory and practice of in situ hybridization, in *In Situ Hybridization: A Practical Approach* (Wilkinson, D. G., ed.), IRL, Oxford, pp. 1–14.

15. Moorman, A. M., de Boer, P. A. J., Vermeulen, J. L. M., and Lamers, W. H. (1993) Practical aspects of radio-isotopic in situ hybridization on RNA. *Histochem. J.* **25**, 251–266.
16. Durrant, I., Brunning, S., and Eccleston, L. (1993) DNA and RNA colour kits for nonradioactive in situ hybridization. *Life Sci.* **12**, 7,8.
17. Brunning, S. and Durrant, I. (1994) Oligo colour kit: a new probe labelling kit for nonradioactive in situ hybridization. *Life Sci.* **14**, 19.
18. Angerer, L. M. and Angerer, R. C. (1992) In situ hybridization to cellular RNA with radiolabelled RNA probes, in *In Situ Hybridization: A Practical Approach* (Wilkinson, D. G., ed.), IRL, Oxford, pp. 15–32.
19. Cunningham, M. and Harvey, B. (1992) A rapid method for monitoring nonradioactive labelling of DNA with fluorescein-11-dUTP. *Highlights*, **4**, 8,9.
20. Cox, K. H., DeLeon, D. V., Angerer, L. M., and Angerer, R. C. (1984) Detection of mRNAs in sea urchin embryos by in situ hybridization using asymmetric RNA probes. *Develop. Biol.* **101**, 485–502.
21. Brunning, S., Cresswell, L., Durrant, I., and Eccleston, L. (1993) General introduction to in situ hybridization techniques, in *A Guide to Radioactive and Nonradioactive In Situ Hybridization Systems.* Amersham International, Amersham, pp. 5–12.
22. Terenghi, G. and Fallon, R. A. (1990) Techniques and applications of in situ hybridization, in *Curent Topics in Pathology: Pathology of the Nucleus* (Underwood, J. C. E., ed.), Springer-Verlag, Berlin, pp. 290–337.

第三部分
基因克隆技术

第二十二章　DNA 的体外包装

Jeremy W. Dale, Peter J. Greenaway

1. 引　　言

在 λ 噬菌体的正常生活周期中，最终构成噬菌体颗粒头部的蛋白质被装配到一个空的头部前体(前头部)中，噬菌体 DNA 复制后插入空头部颗粒中——此过程称作包装。在包装过程中某些噬菌体基因产物具有重要的作用。其中有：

① E 蛋白：它是噬菌体头部的主要组分，编码 E 蛋白的 *E* 基因发生突变的 λ 噬菌体突变型不能装配前头部，并因此积累其他的未组装的噬菌体颗粒组分以及参与包装的其他蛋白质。

② D 蛋白和 A 蛋白：它们参与包装过程，编码这两个蛋白的基因发生突变的 λ 噬菌体突变型能形成前头部，但不能包装 DNA，这会导致空的前头部的积累。

体外包装须用到两种细菌抽提物：一种来源于被 λ 噬菌体 D 突变株感染的细胞，另一种来源于被 λ 噬菌体 E 突变株感染的细胞。混合这两种提取物可体外互补，并因此具有装配成熟噬菌体颗粒的能力。可是，包装反应仅仅针对具有某种特性的 DNA 有效。λ 噬菌体 DNA 是以多倍长度的线状分子复制的。与包装有关的酶(特别是 A 蛋白)识别该 DNA 上的特定位点（*cos* 位点），在该点切开 DNA 并开始将 DNA 包装进噬菌体头部。包装一直进行到第二个 *cos* 位点，在这位点上切开，于是便在噬菌体头部中形成一个单一的完整的 λ 噬菌体 DNA 分子。(*cos* 位点上的切口是不对称的，从而产生成熟的线性 λ 噬菌体 DNA 的单链黏性末端)。因此，只有带有 *cos* 位点的 DNA 分子才被包装。

此外，为了产生能感染细菌细胞的噬菌体颗粒，两个 *cos* 位点间的 DNA 长度须在一定的限度内（包装限度）。如果 DNA 长度大于 λ 噬菌体 DNA 大小的 105%（大于 53 kb)，在第二个 *cos* 位点到达前，头部已填满而使第二个切口不能形成。如果 DNA 长度小于 λ 噬菌体 DNA 长度的 80%，当第二个 *cos* 位点到达时切口才形成，于是噬菌体头部内的 DNA 将不足以维持颗粒的结构完整性。

包装限度的存在，在一定意义上降低了 λ 噬菌体载体的实用性，这是因为它限制了能被克隆的插入片段的大小，然而，这也可以作为它的优点，因为它允许我们在所需要的大小范围内选择要用的插入片段。

另外，体外包装还可应用于一种称为黏粒（cosmid）的特殊类型的克隆载体[1,2]，它是一种带有 *cos* 序列的质粒。包装反应依赖于间隔有适当长度 DNA 的 *cos* 位点的存在，但对于这些 *cos* 位点间的 DNA 的性质是无所谓的。黏粒载体本身太小所以不能包装成为一个可生存的颗粒，因而只有在一个大的外源 DNA 片段插入之后，才能获得用

于包装的适当大小的 DNA 分子。

所以，作为一个介导 DNA 进入细菌细胞的方法，体外包装和转化/转染相比，它有两个优点。首先，这种方法更为有效，尤其是在使用大 DNA 分子如 λ 载体或带有大的插入片段的黏粒时。其次，在有大的插入片段时，它提供了一种选择这些大的插入片段的方法。

应当注意本章只不过是对这一复杂问题作一个简单的介绍，在具体运用 λ 或黏粒载体或体外包装前，建议查看有关的专门书籍。本章介绍的步骤包括制备包装混合物的方法（参见注释 1)，这些包装混合物在市场上也有商品供应。

2. 材　　料

1）包装菌株：

BHB2688：为 cI_{ts} b2 *red*3 *Eam*4 *Sam*7 的溶原菌

BHB2690：为 cI_{ts} b2 *red*3 *Dam*15 *Sam*7 的溶原菌

cI_{ts}突变使溶原菌可为热所诱导而进入裂解性生长，因为突变型产生的 λ 噬菌体阻遏物不耐热。b2 缺失和 *red*3 突变可减少因包装提取物中存在内源 DNA 而引起的本底。*Sam*7 突变使噬菌体丧失裂解能力，因而在诱导溶原菌后，使噬菌体产物在其中积累，*D* 和 *E* 基因突变的作用在引言中已有叙述，*D*、*E* 和 *S* 突变都是琥珀突变，因而噬菌体能在琥珀抑制型宿主中正常生长。

2）L 肉汤培养基：15 g 蛋白胨，5 g 酵母提取物，5 g NaCl，以上成分溶解在约 600 ml 水中，用 NaOH 调 pH 值到 7.2，加水到总体积 1 L，以 500 ml 分装在两个 5 L 烧瓶中高压灭菌。

3）蔗糖- Tris 缓冲液：10％蔗糖，50 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5。

4）溶菌酶：溶菌酶溶解在 0.25 mol/L Tris-HCl 中，浓度为 2 mg/ml、pH 7.5；现配。

5）液氮。

6）包装缓冲液：5 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，30 mmol/L 亚精胺，60 mmol/L 丁二胺，20 mmol/L $MgCl_2$，15 mmol/L ATP，3 mmol/L 2 -巯基乙醇。

7）超声处理缓冲液：20 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，3 mmol/L $MgCl_2$，5 mmol/L 2 -巯基乙醇，1 mmol/L EDTA。

8）噬菌体缓冲液：7 g Na_2HPO_4，3 g KH_2PO_4，5 g NaCl，0.25 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，0.015 g $CaCl_2$，0.01 g 明胶，加水到 1 L。小体积分装并高压灭菌。

9）敏感的 *E.coli* 菌株。

3. 方　　法

3.1　包装混合物 A（包装蛋白）的制备

1）将 L 肉汤培养基中的 BHB2688 在 30℃ 中培养过夜。

2）将过夜培养物接种到 500 ml 的 L 肉汤培养基中，30℃ 振荡培养，当 OD_{650}达到 0.3

时从摇床上取下烧瓶并在45℃水浴中放15 min，不须振荡。目的是诱导噬菌体。

3）将烧瓶转移到旋转式振荡器上，37℃培养1 h。

4）9000 *g*（6×250 ml转头，8000 r/min）离心10 min以回收细胞。

5）尽可能移去上清液，倒置试管至少5 min以便流干上清液。

6）在约2 ml的蔗糖-Tris缓冲液中重新悬浮细胞。以0.5 ml分装悬浮液，向每管中加入50 μl的现配的溶菌酶溶液，轻轻倒转使混合。

7）在液氮中迅速冷冻悬浮液。

8）从液氮中取出试管(注意：用镊子)，在0℃中放置至少15 min以使细胞解冻。

9）合并已解冻细胞，加50 μl包装缓冲液，以48 000 *g*（8×50转头，20 000 r/min）离心30 min。吸取上清液，以50 μl分装在预冷的微型离心管中。液氮中冻结试管，然后-70℃冷藏，备用。

3.2 包装混合物B（噬菌体头部）的制备

1）将菌株BHB 2690进行3.1小节的1～5步的操作。

2）把细胞重新悬浮于5 ml冷的超声处理缓冲液中，超声处理细胞直到悬浮液不黏为止，整个操作过程中都须将装有悬浮液的试管放在冰水浴中，用短阵超声处理(3～5 s)，避免产生泡沫。

3）以15 000 *g*(6×250 ml转头,10 000 r/min)将悬浮液离心10 min。

4）吸取上清液，以50 μl分装到预冷的微型离心管中。在液氮中迅速冻结，然后于-70℃保存备用。

3.3 包装反应

1）解冻已制备好的包装提取物A和B各一管。

2）在含有7 μl超声处理缓冲液的微型离心管中，加入待包装的DNA 1～2 μl（参见第二十三和二十五章）。

3）加1 μl包装缓冲液，10 μl的提取物A和6 μl的提取物B。25℃保温60 min。

4）取0.5 ml的噬菌体缓冲液稀释，与适当的λ敏感的宿主混合接种在BBL琼脂平皿(适用于λ载体)上，或在含有抗生素的选择平皿(适用于黏粒)上培养。

5）记下所产生的噬菌斑数或转化子数，并用如杂交或免疫筛选方法(参见第二十六章)对特定的插入DNA序列进行检测。

4. 注　释

(1）制备包装提取物还有几个可供选择的方法，其他方法的实例可参看文献[3~6]。

参 考 文 献

1. Collins, J. and Hohn, E. (1978) Cosmids: a type of plasmid gene cloning vector that is packageable *in vitro* in bacteriophage heads. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75,** 4242–4246.
2. Hayley, J. D. (1985) Cosmid library construction, in *Methods in Molecular Biology, vol. 4: New Nucleic Acid Techniques* (Walker, J. M., ed.), Humana, Clifton, NJ.
3. Enquist, L. and Sternberg, N. (1979) *In vitro* packaging of lambda Dam vectors and their use in cloning DNA fragments. *Meth. Enzymol.* **68,** 281–298.
4. Hohn, B. (1979) *In vitro* packaging of lambda and cosmid DNA. *Meth. Enzymol.* **68,** 299–309.
5. Hohn, B. and Murray, K. (1977) Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74,** 3259–3263.
6. Sternberg, N., Tiemeier, D., and Enquist, L. (1977) In vitro packaging of a lambda dam vector containing EcoRI DNA fragments of *Escherichia coli* and phage P1. *Gene* **1,** 255–280.

第二十三章　应用 λ 置换型载体构建哺乳动物基因组文库

Alan N. Bateson, Jeffrey W. Pollard

1. 引　言

基因组文库是克隆基因，尤其是那些与遗传性疾病有关的突变基因所必须的，且最终为测定整个基因组的序列提供手段。理想的基因文库应由足够的覆盖整个基因组的重叠序列的克隆组成。通过将基因组 DNA 随机打断，再把各个片段克隆到适当的载体上便可实现[1]。最先用来构建文库的第一类载体是 λ 噬菌体载体。用这些 λ 载体构建的基因组文库容易导入宿主细菌，而且它可接纳长达 25 kb 的基因组 DNA 插入片段。此外，业已构建的黏粒(λ 噬菌体/质粒的杂种载体)能接纳长达 40 kb 大的基因组插入片段，且文库经平皿培养后，能用与处理质粒相同的方式加以处理[2]。也可用细菌的质粒载体构建基因组文库。不过由于受质粒转化效率的限制使它们只能用于构建小的基因组文库，如病毒、酵母和黏菌的。克隆基因组 DNA 大的区段，必须利用克隆中的重叠序列将许多基因组克隆进行排序。这里须要进行多次克隆分离，然后用从克隆的 DNA 片段末端得到的探针对文库进行筛选以挑选出相关的克隆，这一过程称为“步移”(walking)，如此循环下去便可实现排序。为了提高“步移”的速度，已开发了 P1 噬菌体，PAC，BAC 和 YAC 载体，以克隆大小范围为 100～1000 kb 的 DNA 大片段[3]。这些载体是构建大基因组原始文库的首选载体。然而在这些情况下，仍须用 λ 噬菌体和黏粒文库制备亚文库，以便把这些较大的克隆分解成较小的更易处理的片段，以及克隆在其他形式的文库中不易被克隆的小片段。

本章介绍 λ 置换型载体的使用，但同样的原理也可应用于黏粒载体中基因组文库的构建。λ 噬菌体有一个线性基因组，它可分为三个部分。左臂和右臂是裂解性生长所必需的，但中央部分是可省略的[4]。因此这个被称作“填充”片段的中央片段可以被外源 DNA 置换。由于 λ 可高效地包装的基因组大小是野生型基因组的 78% 到 105%，所以能接纳 7～24.2 kb 的基因组 DNA 片段，这些基因组 DNA 片段可以通过机械剪切也可以通过限制性内切酶的酶解产生。机械剪切能形成真正的随机 DNA 片段，但由于这些片段是平末端的，所以它们的连接效率很低。拟随机切割可通过用识别 4 bp 识别序列的限制性内切酶进行不完全消化取得，理论上在一般的基因组中每 256 bp 有一个这种切点。适当大小范围内的 DNA 片段可通过大小分级分离开来，然后能有效地连接到适当酶切的 λ 臂上。限制性内切酶 *Sau*3A 及与其有相同识别位点的如 *Mbo* Ⅰ 和 *Dpn* Ⅱ 对拟随机切割特别有用，因为它们产生的黏性末端与存在于众多载体中的 *Bam*HⅠ位点可配对。也可采用酶切 6 bp 识别序列的内切酶，但它的酶切频率的降低将减小获得重叠克隆的可能性。

因为 λ 噬菌体有一最小包装尺寸(~40 kb)，所以消除了由不含基因组插入片段的互相连接的 λ 臂所形成的本底。可是，由于与填充片段的重新连接，包装反应的本底还会出现。这种本底可以用几种方法使之降低。

① 多数载体含有位于填充片段两侧的合成的多克隆位点序列。大多数情况下用双酶酶切可从填充片段中消除可配对的黏性末端。此外，一些载体在它们的填充片段上含有一个惟一的限制酶酶切位点，利用此位点可将填充片段消化成较小的片段。例如 EMBL4 含有一 *Sal* I 位点而 Charon 40 有一能被内切酶 *Nae* I 切割成许多小片段的合成的“多聚填充片段”。

② 实际上，甚至在多重消化后，用物理方法去除填充片段也可提高文库的构建效率。用蔗糖梯度离心是达到这一目的的最好方法。

③ Spi 选择系统可用来消除含有填充片段的噬菌体[5~7]。这种方法是有效的，因为含有 *red* 和 *gam* 基因的噬菌体在携带 P2 的溶原菌菌株的平皿上面不能形成噬菌斑。*red* 和 *gam* 基因位于填充片段中，所以重组噬菌体是 Spi^-，可以自由生长。然而，这种选择同时带来了两个麻烦。第一，载体中须要有 *chi* 位点以维持高的复制率，如果缺少 *chi* 序列，在一些基因组插入片段中的隐蔽位点的存在可能导致具有较高复制率的重组 λ 噬菌体分子出现，因而使它在群体中以过高的比例出现[5,6]。第二，gam^- 噬菌体只在 $recA^+$ 宿主细胞中有效地复制，可是 DNA 中某些重组基因序列的存在可能须要用一个 $recA^-$ 宿主。这时，可利用 red^- 和 gam^+ 载体，这种载体中 *gam* 基因已被转移到 λ 的一个臂上[8]。

已经构建了许多具有上述特性的 λ 置换型载体，这些载体可用于文库的构建。λDASH，λFIX，λ2001 和 EMBL 载体有不同的多克隆位点序列，并且都可进行 Spi 筛选。λDASH 和 λFIX 还含有 T7 和 T3 RNA 聚合酶启动子，从而可以产生核糖探针(参见第十二章)而使基因组的步移更容易进行。载体 Charon 32～35 和 40 都是 red^- 和 gam^+，因此有利于克隆较难克隆的 DNA 序列。为了简明起见，本章介绍用 EMBL4 载体构建文库，该方法可应用于上述所有载体。

2. 材　　料

使用优质的化学药品和试剂，除另外说明外，所有溶液都是室温贮存，酶，如 *Bam*H I，*Sal* I，*Mbo* I，T4 DNA 连接酶和 DNase I 及随之供应的相应的缓冲液都应在 -20℃ 存放。

2.1 噬菌体原种的制备

1）菌株和噬菌体：下列宿主适用于 λEMBL4[6]：

QR48：供亲本载体生长的 $recA^-$ 宿主。

NM538：用作第二次筛选和测 EMBL4 亲本效价用的重组噬菌体的生长的宿主。

NM539：用在原始文库中检测 spi^- 重组子。

LE392：供野生型 λ 噬菌体生长及测效价。

2）L 肉汤培养基：总量 1 L 中溶解 10 g 细菌培养用胰蛋白胨，5 g 酵母提取物和 5 g NaCl，调 pH 值到 7.2，高压灭菌，培养 λ 则加 10 mmol/L $MgSO_4$。

3）CY 培养基：总量 1 L 中溶解 10 g 酪蛋白水解物，5 g 酵母提取物，3 g NaCl，2 g KCl 和 2.46 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$，调 pH 值到 7.5 并高压灭菌。

4）10 mmol/L $MgSO_4$。

5）λ 梯度缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl，100 mmol/L NaCl，10 mmol/L $MgSO_4$、pH 7.4。

6）氯化铯：按 3.1 小节步骤 17 的指导配溶液。

7）λ 透析缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl，25 mmol/L NaCl，10 mmol/L $MgSO_4$、pH 8.0。

2.2　噬菌体 DNA 的制备

8）0.5 mol/L EDTA、pH 7.0。

9）10%SDS（w/v）。

10）蛋白酶 K：10 mg/ml 溶液，溶于 10 mmol/L Tris-HCl，5 mmol/L EDTA，0.5%（w/v）SDS、pH 7.8。

11）酚：重蒸酚平衡到终浓度为 0.1 mol/L Tris-HCl、pH 8.0，反复用 0.5 mol/L Tris-HCl 平衡以确保 pH 值达到 8.0。酚有腐蚀性并有毒，必须小心处理。

2.3.　λ 臂的制备

12）蔗糖梯度缓冲液：配制从 15% 到 35%（w/v）梯度的蔗糖溶液（在1 mol/L NaCl，20 mmol/L Tris-HCl，5 mmol/L EDTA、pH 8.0溶液中）。

13）酚/氯仿：1∶1 混合酚和氯仿。

14）3 mol/L 醋酸钠、pH 6.0。

15）异丙醇。

16）0.01 mol/L $MgCl_2$。

17）TE 缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA、pH 7.5。

2.4　基因组 DNA 的不完全消化

18）加样缓冲液：4%（w/v）蔗糖，0.25%（w/v）溴酚蓝和 0.25%（w/v）二甲苯青的水溶液。

19）终止液：28 mmol/L EDTA、pH 8.0，溶于 25%（v/v）加样缓冲液中。

2.5　文库的构建

20）包装混合物：可购买或自制（参见第二十二章）。

21）SM 培养基：总量 1 L 中溶解 5.8 g NaCl，2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 20 g 明胶于 950 ml 水和 50 ml 1 mol/L Tris-HCl、pH 7.5，高压灭菌。
22）氯仿。
23）上层琼脂：7 g 细菌培养用琼脂溶于补充有 10 mmol/L $MgSO_4$ 的 1 L L-肉汤培养基中，高压灭菌。
24）底层琼脂：15 g 细菌培养用琼脂溶于补充有 10 mmol/L $MgSO_4$ 的 1 L L-肉汤培养基中，高压灭菌。

3. 方　　法

3.1　噬菌体原种的制备

1）取冷冻的细菌 QR48 的原种，接种到 10 ml 的 L-肉汤培养基中，37℃培养。
2）将 1 ml 过夜培养物接种到含有 50 ml CY 培养基的锥形烧瓶(至少4倍于培养基体积)，并在 37℃振荡(250 r/min)培养 2～2.5 h，直到 OD_{630}为 0.4。
3）在 4℃中以 3000 *g* 离心 10 min 收集细胞，倒去上清液，用 25 ml 的 10 mmol/L $MgSO_4$重新悬浮沉淀细胞，悬浮液于 4℃中可保存 10 天，但出斑率最高的是 0～2 天内的细胞。
4）为获得噬菌体的最大收获量，须计算噬菌体感染细菌的最适比率——感染比。这是在大规模的噬菌体制备之前的小规模实验中测定的（参见注释 1)。实验前一天，测定宿主细菌 QR48 和噬菌体溶菌产物两者的效价[1,8]（参见注释 1)。
5）在各支灭菌的 1.5 ml 小管中接种 0.1 ml 含有 2×10^8 个宿主细菌与 0.1 ml 下列效价的噬菌体：10^8、5×10^7、10^7、5×10^6、10^6 和 5×10^5pfu。室温培养 15 min 使噬菌体颗粒吸附到细菌上。
6）小心将每管培养物分别转移到含有 10 ml 预热到 37℃的 CY 培养基的 100 ml 的锥形烧瓶中，在旋转式摇床上 37℃中以 140 r/min 振荡培养过夜。
7）4℃中以 12 000 *g* 离心 10 min 以澄清溶菌产物，滴定上清液效价，并测定最适感染比。
8）接着进行大规模噬菌体的制备，将 4×10^9 宿主细菌与最适感染比的噬菌体一起接种到一个 1.5 ml 的灭菌的塑料试管中。室温培养 15 min。
9）将培养物小心地转移到一个含有预热到 37℃的 200 ml CY 培养基的 2 L 锥形烧瓶中，置旋转式摇床上，在 37℃中以 140 r/min 振荡过夜。
10）培养过夜的培养物应仍是浑浊的，但随着大量的裂解，呈现出细菌细胞碎片的纤维状固块。如果不是这样，可把烧瓶在 4℃中放 1～2 h 以增加细胞的裂解。
11）以 5 000 *g* 在 4℃中离心 20 min 以去除细胞碎片。
12）转移上清液到 50 ml 多聚碳酸酯的超离心管中以 75 000 *g* 在 4℃中离心 1 h。
13）倒去上清液，沉淀物中央会呈黄褐色(碎片)，周围为浅蓝色半透明噬菌体环。
14）每管加 0.48 ml 4℃的 λ 梯度缓冲液，重新悬浮沉淀，倾斜试管使缓冲液浸没沉淀，让噬菌体扩散过夜。

15）轻轻地转移到一个硅化的 15 ml 的玻璃离心管中，4℃ 中以 12 000 g 离心 5 min 以除去细胞碎片。

16）转移上清液到一洁净的 15 ml 玻璃离心管中，加 100 μg DNase I，室温放置 1 h。

17）在 λ 梯度缓冲液中配备三级氯化铯梯度，浓度分别是 1.7 g/cm^3（75 ml 中加 95 g；η 为 1.3990），1.5 g/cm^3（82 ml 中加 67 g，η 为 1.3815）和 1.30 g/cm^3（90 ml 中加 40 g；η 为 1.3621）。用蠕动泵将 2 ml 1.7 g/cm^3，3 ml 1.5 g/cm^3 和 2 ml 1.3 g/cm^3 小心地依次铺层到 12 ml 透明的超速离心管中。标出每层的界面。

18）用蠕动泵小心地铺噬菌体悬浮液层，并用梯度缓冲液加满离心管。

19）用超速离心机的“慢加速”和“不用刹车”模式，以 160 000 g 在 20℃ 中离心 1 小时 40 分钟。

20）图 23.1 表示预期的分带格局（参见注释 2）。用带 21 号针头的注射器小心地取出噬菌体区带。方法是在区带上贴一小块透明胶纸，然后在区带的下方刺穿试管，针头的斜口边朝上。当心别让针头穿透离心管而刺破手指。

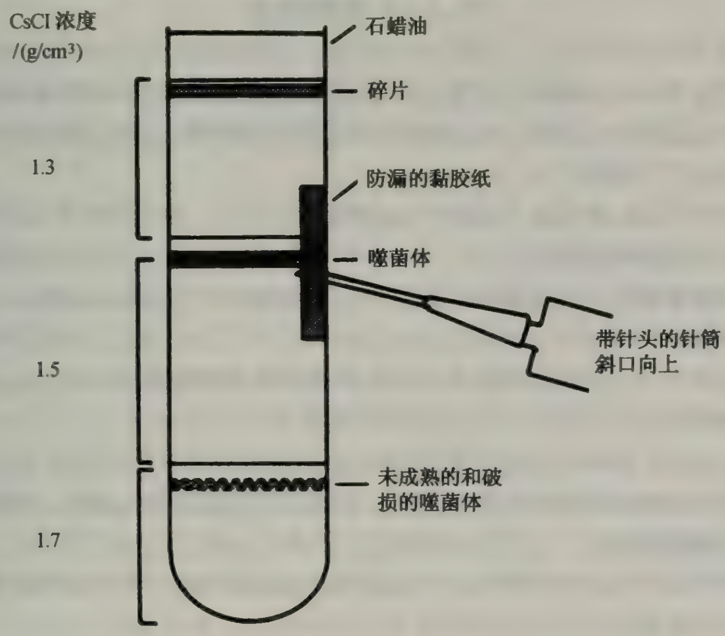


图 23.1　图示在氯化铯分级梯度超离心后，预期的噬菌体制备物的分带格局。紧靠在 1.3～1.5 g/cm^3 氯化铯交界面下面的是完整的噬菌体区带，如图所示用带针头的注射器从梯度中抽出这一区带。

21）在 4℃ 中用透析缓冲液透析噬菌体，换液两次，每次用 2 L。

22）滴定噬菌体效价（参见注释 3）。

3.2　噬菌体 DNA 的制备

1）在噬菌体制备物中加 1/50（v/v）的 0.5 mol/L EDTA。

2）加 1/50（v/v）的 10% SDS 溶液并在 65℃中保温 15 min。
3）冷却到 45℃，加蛋白酶 K 到终浓度为 50 μg/ml，并在 45℃中保温 1 h。
4）用酚抽提，小心地倒转试管几次。
5）在 4℃中以 7800 *g* 离心 5 min，使分成两相。
6）重复上述过程三次，每次用酚抽提水相。
7）用氯仿抽提水相两次以去除酚，每次以 7800 *g* 离心 5 min 使分成两相。
8）用水饱和的乙醚抽提水相三次以去除氯仿，每次以 1000 *g* 离心 2 min 使分成两相。
9）真空中放置片刻以去除乙醚。
10）最终的上清液作梯度稀释后在 0.5%(w/v)的琼脂糖凝胶上电泳，用已知浓度的 λ 作标准。
11）根据琼脂糖凝胶的电泳结果估计 DNA 浓度，或在 260 nm 和 280 nm 下测吸光率以求更为准确，OD 260/280 比应是 1.8。1 OD＝50 μg/ml（参见注释 4）。

3.3 λ臂的制备

1）在着手进行臂的大规模制备之前，要确保小规模制备的 DNA 能被 *Bam* H I 完全酶切。取 0.5 μg DNA 加 2 U 的 *Bam* H I 在适当的缓冲液（由厂商提供）中组成 10 μl 反应体系，37℃保温 1 h。
2）DNA 在 65℃保温 10 min（以解开 *cos* 末端），冷却，在 0.5%（w/v）琼脂糖凝胶上进行电泳分析酶切结果。
3）如果电泳结果显示已完全酶切，则进行大规模酶切，如尚未完全酶切，则用酚进一步抽提 DNA。
4）在 500 μl 体积中用 300 U 的 *Bam* H I 和适当的缓冲液酶切 150 μg 的载体 DNA，37℃保温过液。
5）0.5 μg 的 DNA 在 68℃中热处理 10 min 后与适当的标准物一起在 0.8%（w/v）琼脂糖凝胶上电泳以检查酶切是否完全。如反应不完全则加大酶量，调整缓冲液和酶切体积，继续保温。
6）一旦酶切完全，加 300 U 的 *Sal* I 并适当地调整缓冲液，37℃酶切过夜以切割填充片段（参见注释 5）。
7）制备 12 ml 15%～35%的蔗糖梯度（参见注释 6）。
8）用等体积的酚/氯仿抽提酶切过的 DNA 一次，在微型离心机上离心 5 min 使之分层，再用等体积的氯仿抽提以再次分层，用 300 mmol/L 的醋酸钠和 0.6 倍体积的异丙醇沉淀 DNA（参见注释 5）。
9）在微型离心机上离心以沉淀 DNA，在 Speed-Vac 中干燥 DNA，再用 200 μl 的 TE 缓冲液重新悬浮 DNA。在 0.01 mol/L $MgCl_2$ 中，于 42℃保温 1 h 使 DNA 的黏性末端复性，然后取一份含 0.5 μg DNA 的样品进行电泳检测分析。
10）如果 DNA 是完整的，将剩余的 DNA 铺层于梯度上，用“慢加速”和“不用刹车”模式在 15℃中以 140 000 *g* 离心 19 h。
11）用 21 号针头插入试管的底部收集管内溶液，每管收集 0.5 ml。(管口可以封上封口

膜以阻止管内溶液的涌出，在封口膜上开一个非常小的孔，管内溶液便开始流出，不然，可以用购得的梯度分离仪。）

12）每隔一管取出 10 μl，用 35 μl 的水稀释并加 8 μl 的上样缓冲液，68℃ 加热 10 min，在 20 cm×20 cm 0.5%(w/v)琼脂糖凝胶上进行电泳，将经适当的限制酶酶切的 λ 作为标准，标准中盐和蔗糖浓度要调整到与样品一致。

13）确定含有 λ 臂(20 kb 和8.9 kb)的一些收集管，将它们合并。

14）如果收集的样品体积大时，用 TE 缓冲液透析，或者用 TE 缓冲液三倍稀释，然后用二倍体积的 95% 乙醇沉淀过夜，沉淀时不另外加盐。通过离心再度回收沉淀物，用 70% 的乙醇洗涤，于 Speed-Vac 中干燥后溶解在适当体积的 TE 缓冲液中（使达 300～500 μg/ml)。

15）用 260 nm 处的吸光率测定其确切浓度，5 μg 分装样品并保存在 -20℃ 中。

3.4 基因组 DNA 的不完全酶切（参见注释 8）

1）开始大量酶切之前进行试验性酶切，取 10 μg DNA、3 μl *Mbo* Ⅰ 缓冲液（10×贮存液）和水至终体积 27 μl，37℃ 保温。

2）准备供 0～60 min 范围内各个预定反应时间用的 13 个试管，置于冰上，每管加 5 μl 终止液。

3）用冰冷的灭菌水稀释 *Mbo* Ⅰ 内切酶母液到 0.5 U/μl，置于冰上。

4）快速地加稀释过的酶 3 μl 到已预热的 DNA 中，混合并开始计时。

5）立即取出 2 μl 加到第一个定时试管中，然后每 5 min 取 2 μl，持续 1 h。

6）每个定时样品都在一块大的(20 cm×20 cm)0.3%(w/v)琼脂糖凝胶上电泳，用 λ 和经 *Xho* Ⅰ 或 *Hin*dⅢ酶切的 λ 做标准，电泳后染色并摄影。

7）确定在 15～22 kb 范围内产生最强荧光所需的酶切时间，理想的情况下大约为 30 min。

8）扩大规模到在 450 μl 总体积中酶切 150 μg DNA。不过这一酶切反应仅需相应酶浓度的一半，便可产生最大量的所需大小范围的分子[1]。用小规模实验的最适时间 ±5 min来确定确切的时间，在每个预定反应时间加 150 μl 的反应混合物到一含 EDTA、pH 8.0，终浓度为 20 mmol/L 的冰冷的微型离心管中以终止实验。

9）将这三份酶切过的样品合并，然后按在 λ 臂的制备中描述的那样加在 15%～35%(w/v) 蔗糖梯度上（参见注释 6)。

10）离心后，分级收集梯度，从每隔一管的收集物中取 10 μl 在 0.3%（w/v）的琼脂糖凝胶上连同适当的标准作对照一起进行电泳。

11）按琼脂糖凝胶上测定的大小在各收集管上贴上标签（参见注释 9)。

12）将收集的每一部分稀释三倍，用二倍体积的 95%(v/v)乙醇沉淀，在 Speed-Vac 中干燥后再悬浮于 20 μl 的灭菌 TE 缓冲液中。

13）在 0.8%(w/v)琼脂糖凝胶上，用已知浓度的标准作对照电泳检测 DNA 的浓度。

3.5 文库的构建

1）DNA 总量为 1 μg 的连接反应先以 λ 臂与插入片段分别为 4:1，2:1，1:1，0.5:1 之比进行预试验（参见注释 10）。用 1 U 的 T4 DNA 连接酶连接 150 μg/ml DNA 的反应于 4℃ 进行过夜。另外在相似的条件下单独进行 0.5 μg 载体臂的连接以便估计被填充片段污染的载体所造成的本底（参见注释 11 和 12）。

2）用购得的包装试剂盒或用按第二十二章[1,9]中介绍的方法自制的包装组分包装 250 ng连接过的 DNA。同时还应包装天然的 λ 以便确定提取物的包装效率（销售的包装试剂盒总是提供这个对照）。

3）从 -70℃ 冷藏柜中取出冻融过的裂解物和超声处理过的提取物，放在冰上融化。冻融过的裂解产物将首先融化，把它加到仍处于冻结状态的超声处理过的提取物中，轻轻地混合。当它们几乎完全，但还未完全融化时，加入待包装的 DNA，混匀并于室温中保温 1 h。

4）加 0.5 ml 的 SM 培养基和一滴氯仿，混匀。

5）在微型离心机上离心 30 s 以去除碎片，用下列菌株测定被包装 DNA 的效价：

λ——LE392

臂+插入片段——NM539（spi^-选择）

臂——NM538 和 NM539

6）计算 λ 和臂加插入片段的包装效率（参见注释 13）。λ 的包装效率应比重新连接物高约 100 倍。

7）在连接试验中如果某一组反应的包装效率相当高，那么选择这一比率并扩大反应规模以产生一个完整的文库（参见注释 13～15）。测试一小样。

8）一旦制成文库，应按注释 14 中介绍的方法测试文库的完整性，文库在有氯仿时可以无限期地贮存。此后文库便可根据需要先行扩增或直接筛选[1,5]（参见第二十六章）。

9）文库可像培养平皿原种一样进行扩增，应确保噬菌斑不相互覆盖生长以减少不同的重组噬菌体之间重组的可能性。为了制备平皿原种，将 50 μl 体积中含有 2×10^4 个重组子的包装反应的样品与 0.2 ml 的宿主细菌混匀，在 37℃ 中保温 20 min。

10）分别把每一样品加入 6.5 ml 熔化的上层琼脂中，混匀后倒入 150 mm 平皿中已干燥的底层琼脂上。

11）保温 8～10 h，确保这些平皿是绝对水平的，以尽量减少克隆的扩散可能性。

12）将 12 ml 的 SM 培养基铺在平皿上，于 4℃ 中放置过夜。

13）取出噬菌体悬浮液并将它转移到一个灭菌的聚丙烯管中，用 4 ml 的 SM 培养基冲洗平皿，合并到原悬浮液中。

14）加入氯仿至终浓度为 5%（v/v），并于室温中放置 15 min，不时摇动。

15）以 4000 *g* 在 4℃ 中离心 15 min 以去除细胞和琼脂碎片并回收噬菌体。

16）取出上清液，加氯仿至终浓度为 0.3%（v/v），至此文库可于 4℃ 中存放多年。如果需要的话，可用前面介绍的 CsCl 梯度离心法将文库浓缩。

4. 注　　释

(1) 为要得到大量的噬菌体，玻璃器皿必须非常清洁。用铬酸浸泡后再用蒸馏水彻底冲洗才能达到这一要求。同时必须保持严格的无菌控制，因为 λ 的单链 *cos* 末端是极度脆弱的而它的完整性是必不可少的。值得一试的是在 10 mmol/L $MgCl_2$ 中于 42℃保温 1 h，然后在 0.3%（w/v）琼脂糖凝胶上电泳以分析 *cos* 末端是否会复性。显然，妥善管理噬菌体和细菌原种的保存和检验也是必要的。详见参考文献[1]。

(2) 如果氯化铯梯度中最低的区带比噬菌体带大，这说明在混合和吸取时力量太大。如果顶端区带太大，将会污染噬菌体制备物。因此，可能须要在另一个梯度上再度离心噬菌体制备物。如果产量低，可能须要在制备的每一步测效价，弄清损失发生哪一步以便改进。

(3) 必须始终维持 Mg^{2+} 的浓度，否则噬菌体颗粒将会解体。

(4) 10^{10}pfu 的噬菌体约产生 0.44 μg DNA。因此，从得率为 6×10^{10}pfu/ml 的 200 ml 清除了碎片的裂解液将得到 500 μg DNA，这时的 DNA 应是无杂质的。如果 DNA 的 260/280 比值较低，不管什么原因都应返回到 3.2 小节的第 4 步从新开始。断裂 DNA 的存在通常说明吸取过猛或酚的质量差，这时削去吸管的尖端和重蒸酚的应用都属必要。

(5) EMBL3 和 4 两者的设计都是为了用 *Sal* I 切下填充片段而使臂不受损伤。由于 EMBL4 的 *Sal* I 位点位于 *Bam*H I 位点和填充片段之间（EMBL3 则相反，其 *Bam*H I 位点介于 *Sal* I 位点和填充片段之间，所以 *Sal* I 酶切将不会克隆到 *Bam* H I 位点）。所以用两种酶进行酶切会明显地减小因自连而出现完整的噬菌体基因组的可能性。事实上，因为 *Sal* I 酶切产生的多克隆片段在异丙醇沉淀时由于太小不被沉淀而丢失，因而自连的可能性更小了[4]。这阻止那些逃过由 Spi 筛选施加的遗传选择的假重组子的出现，因而进一步提高了文库的质量。

(6) 载体臂和供体 DNA 两者都可在低熔点的琼脂糖凝胶上分离。但这类凝胶比蔗糖梯度的容量小，且琼脂糖中任何杂质都严重抑制连接反应。因此，实际上我们并不认为这是一个合适的分离 DNA 的方法。

(7) 如果使黏性末端在 10 mmol/L $MgCl_2$ 存在情况下 42℃ 中复性 1 h，则分离臂这一步可以进一步改进。这样可以从蔗糖梯度中分离单一片段的 DNA 并同时得以验证。

(8) DNA 的大小是产生一个完整的文库中最为重要的决定因素。尽管一些断裂是不可避免的，但 DNA 应大于 100 kb，且越大越好；否则，当由限制性内切酶不完全酶切产生一系列的随机片段时，这些片段中将会有很大比例的非黏性末端，由于这些片段只能与两个臂中的一个结合，因而与载体 DNA 连接而形成不能复制的片段，从而明显地降低了包装效率。此外，由于用于包装的噬菌体颗粒通常是多联体，所以这些非黏性末端将导致包装过程的终止。因此，如果供体 DNA 制备物在凝胶上模糊一片时，还是重新制备为好而不是继续进行文库的构建。DNA 质

量差的原因通常是由于机械切割（用未削去尖端的吸管吸放过猛，或剧烈地混合）或由于溶液和玻璃器皿的无菌控制较差而引起 DNase 的污染。

(9) 不要扔掉这些试管，其中的收集物十分珍贵，以后或可作为不同的载体或用于稍大或稍小的插入片段的包装之用。将它们于 −20℃ 保存。

(10) 用下面公式计算所需载体和供体 DNA 量：假定插入片段的大小为 20 kb，其相对分子质量约为 1.27×10^7。臂是 30 kb，相对分子质量为 1.9×10^7，因此，就 1∶1 比来说：

$$(\mu g\ 臂)/(1.9\times10^7)=(\mu g\ 插入片段)/(1.27\times10^7)$$

因此：μg 臂 $=1.496\times\mu g$ 插入片段。对于 1 μg 的反应需 0.6 μg 的臂和 0.4 μg 的插入片段。这须要根据插入片段的平均大小和臂与插入片段之比进行调整[1]。臂与插入片段之比理论上应是 2∶1，但有些分子可能没有黏性末端（见注释 8），因而 DNA 的有效浓度不同于通过测定 DNA 浓度而计算得来的浓度。所以在大规模包装之前有必要做一系列比率的试验。连接前，可用碱性磷酸酯酶处理供体 DNA 以防止自连，这将增加可用末端的有效浓度和连接的效率。注意应检测碱性磷酸酯酶的质量，因为许多制品中含有一些核酸酶活性（参见第二十五章）。

(11) 用琼脂糖凝胶电泳能检测连接是否成功。

(12) 也可在 10 mmol/L $MgCl_2$ 存在的情况下，将载体在 42℃ 中保温 1 h 使载体的 *cos* 末端复性，这也是个好办法。

(13) λ 的 DNA 得率至少应是 10^8pfu/μg DNA，若少于该得率，则包装提取物本身（或者对包装提取物的处理）质量不好，不应进行大量样品包装。记住包装时不要一次解冻许多管包装提取物，而且应将它们放置于冰上。我们还发现分几次进行小规模的包装比只做一次大规模的包装为好，这与对提取物的处理有关，每次我们只用 2～3 小管。载体臂单独在 NM538 上平皿培养时 DNA 得率应小于 10^4pfu/μg，在 NM539 上得率更低。如果包装是高效的，而载体臂 + 插入片段的得率低于 10^6 pfu/μg，则应通过连接商品 λ *Hin*dⅢ酶切产物并用琼脂糖凝胶电泳检测连接效果，用以鉴定连接酶的活力。如果连接酶活力高的话，则只用臂重复第 3.5 小节的第 1 和 2 步，如果琼脂糖凝胶电泳检测结果说明连接是高效的，那么插入 DNA 的质量有问题。正如注释 8 中提到的，这是不能构建一个高质量文库的一个最为常见的原因。

(14) 我们的理想是构建一个尽可能完整的文库，使得哺乳动物基因组中的每个序列至少在文库中出现一次，应用下列公式可以计算得到文库中包含所需序列的概率为 99％时所需的噬菌斑数[1,4]。

$$N=[\ln(1-P)]/[\ln(1-x/y)]$$

上式中 P 是所要求的概率，x 是插入片段的大小，y 是单倍体基因组的大小，N 是必要的重组子数。因此，假定插入片段是 20 kb，要得到 99％被克隆的概率在单个包装反应中约需 8×10^5 个噬菌斑。文库的有效程度可按下列方法检测：随机挑取约 100 个噬菌斑以点阵方式点种在涂满细菌的上层琼脂上，生长后印迹到硝酸纤维素膜上，用标记的宿主细菌的完整的基因组 DNA 做探针进行杂交。因为在哺乳动物基因组中有大量的重复序列，与探针杂交后约 80％的克隆会产生杂交

信号。

(15) 我们经常发现在放大规模时效率有所丧失。这应在最后的包装反应中加以补偿。记住加一滴氯仿使提取物澄净。包装提取物可阻止细菌的生长并降低效价。

致　谢

这一章的内容根据首次在《分子生物学方法》第四卷上发表的一篇论文。写上述论文时作者接受 NIH DK48 960 以及爱因斯坦癌症中心 CA 13 330 的资助。

参 考 文 献

1. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
2. Haley, J. D. (1988) Cosmid library construction, in Methods in Molecular Biology, *vol. 4: New Nucleic Acid Techniques* (Walker, J. M., ed.), Humana, Clifton, NJ, pp. 257–283.
3. Schalkwyk, L. C., Francis, F., and Lehrach, H. (1995) Techniques in mammalian genome mapping. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6,** 37–43.
4. Hendrix, R. W., Roberts, J. W., Stahl, F., and Weisberg, R. A., eds. (1983) *Lambda 11.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
5. Kaiser, K. and Murray, N. (1985) The use of phage lambda replacement vectors in the construction of representative genomic DNA libraries, in *DNA Cloning: A Practical Approach,* vol. 1 (Glover, D. M., ed.), IRL, Oxford, Washington.
6. Frischauf, A. M., Lehrach, H., Poustka, A., and Murray, N. (1983) Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. *J. Mol. Biol.* **170,** 827–842.
7. Burt, D. and Brammer, W. J. (1985) Bacteriophage λ as a vector, in *Basic Cloning Techniques: A Manual of Experimental Procedures* (Pritchard, R. H. and Holland, I. B., eds.) Blackwell Scientific, Oxford.
8. Loenen, W. A. M. and Blattner, F. R. (1983) Lambda charon vectors (32,33,34, and 35) adapted for DNA cloning in recombination-deficient hosts. *Gene* **26,** 171–179.
9. Dale, J. W. and Greenaway, P. J. (1984) Preparation and assay of phage λ, in *Methods in Molecular Biology, vol. 2. Nucleic Acids* (Walker, J. M., ed.), Humana, Clifton, NJ, pp. 201–209.

第二十四章　用于构建文库的双链 cDNA 制备

Steve Mayall，Jane Kirk

1. 引　　言

通过逆转录酶(reverse transcriptase, RTase)以 mRNA 为模板合成 cDNA 是分子克隆中的基本技术。首先应考虑的是取得大量的长 cDNA 拷贝。cDNA 产物的长度和质量主要依赖于用作初始物的 mRNA 的质量，且必须充分注意避免降解。合成中所选用的引物和逆转录酶对最终产物也有影响。

引物通过复性结合到 mRNA 上产生一短的双链区域（图 24.1），然后在禽成髓细胞病毒（avian myeloblastosis virus，AMV）逆转录酶或 Moloney 鼠白血病病毒(Moloney murine leukemia virus，MoMuLV）逆转录酶作用下产生与 RNA 互补的 DNA 链。第一条链合成一个短的发夹环，以前的方法是利用这一发夹环为第二条链合成反应

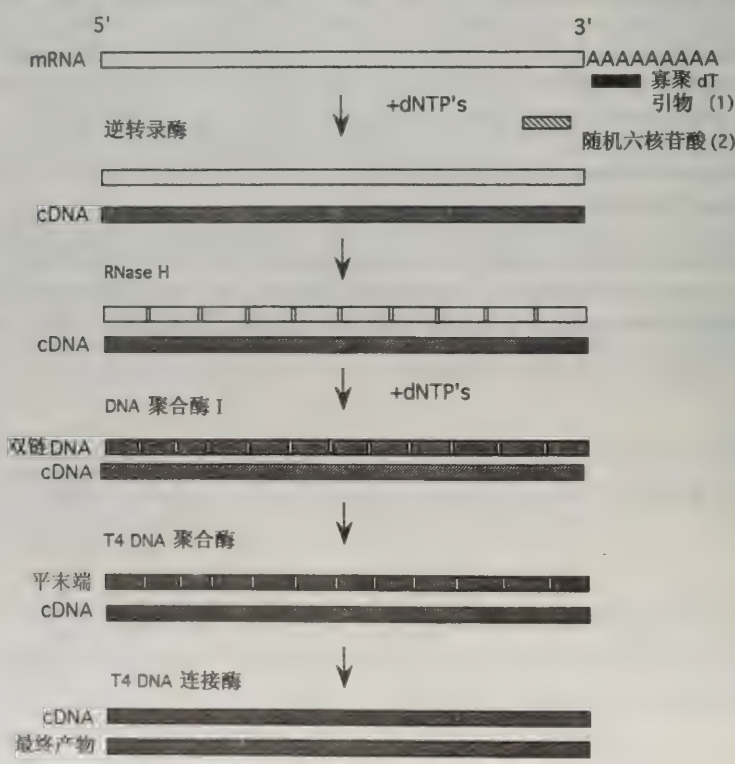


图 24.1　双链 cDNA 的合成过程示意图。

提供引物。随即需要 S1 核酸酶的酶切来去除这一单链发夹区。现在替代它的方法是利用 DNA 聚合酶Ⅰ配合 RNase H 的作用由小段新合成的 DNA 将 mRNA 从杂种分子中置换出来[1,2]。cDNA 合成的规模可用掺入到第一条链和第二条链的放射性核苷酸进行检测。

一连串的小片段双链 DNA 经 T4 DNA 连接酶的作用连接成为一个长链。同时，含有 *Eco*RⅠ位点的接头被连接到 cDNA 的平末端上，然后用 *Eco*RⅠ切割使之能克隆到任何经同样切割的载体上。cDNA 自身中的 *Eco*RⅠ位点由于事先甲基化而不被酶解。

在有盐的情况下精胺沉淀可除去大部分未结合的接头[3]。剩下的接头可在凝胶纯化这一步中除去。凝胶纯化也可用于 cDNA 大小的选择。这一 cDNA 便可被进一步用来连接到所选用的载体上。

2. 材　　料

所有溶液应高压灭菌，并且可能的话，在高压灭菌前先用 0.01% 焦碳酸二乙酯(DEPC)37℃ 处理过夜。不要把 DEPC 加到含有 Tris-HCl 的溶液中。

所有玻璃器皿应用 DEPC 处理和/或 180℃ 烘 3 h。只要可能，应尽量使用经灭菌的一次性的塑料器皿。单链核酸非常容易粘到塑料上，因此塑料试管在使用前应当硅化。无论何时必须戴手套以防止引入 RNase 污染，同时也要充分注意避免外源 DNA 的污染。除非特别指出，所有酶及缓冲液都应贮存于 -20℃ 中。

2.1 cDNA 合成反应

1）10×第一条链合成缓冲液：500 mmol/L Tris-HCl、pH 8.3，500 mmol/L KCl，100 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L DTT，-20℃ 保存。
2）焦磷酸钠（NaPPi，150 mmol/L）：Sigma（St.Louis，MO）公司有售。
3）人胎盘 RNase 抑制物（100 U/μl）：Amersham Life Sciences（Amersham，UK）公司有售，-20℃ 保存。
4）10×dNTP 混合物：dATP，dTTP，dCTP 和 dGTP（每种 10 mmol/L）溶液。Pharmacia（Uppsala，Sweden）公司有售，于 -20℃ 保存。
5）寡聚-$dT_{12\text{-}18}$引物或随机六核苷酸引物（1 mg/ml）：Promega（Madison.WI）公司有售，-20℃ 保存。
6）[α-^{32}P] dCTP（3000 Ci/ mmol）：Amersham Life Sciences 公司有售。
7）polyA$^+$ RNA（200 μg/ml）：于 DEPC 处理过的水中 -70℃ 保存。
8）AMV 逆转录酶（20 U/μl）：Amersham Life Sciences 公司有售，保存于 -20℃ 中。
9）2×第二条链合成缓冲液：50 mmol/L Tris-HCl、pH 8.3，200 mmol/L KCl，10 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L DTT，-20℃ 保存。
10）RNase H（5 U/μl）：Amersham Life Sciences 公司有售，-20℃ 保存。
11）DNA 聚合酶Ⅰ（5 U/μl）：Amersham Life Sciences 公司有售，-20℃ 保存。
12）T4 DNA 聚合酶（4 U/μl）：Amersham Life Sciences 公司有售，-20℃ 保存。

13）平衡酚：同参考文献[4]中所述，加 100 mmol/L Tris-HCl 到饱和、pH 8.0，加氯仿 (1:1 v/v)混合并保存于 4℃ 中。Rathbone（Walkerburn，Scotland）公司有售。
14）饱和的氯仿：加 TE 缓冲液（10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，1 mmol/L EDTA）到饱和，于室温保存。
15）DE-81 圆形滤纸：Whatman（Maidstone，UK）公司有售。

2.2 cDNA 末端加接 *Eco*R I 接头

16）5×缓冲液 M：500 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，500 mmol/L NaCl，5 mmol/L EDTA，－20℃ 保存。
17）10×缓冲液 SAM：800 μmol/L S-腺苷甲硫氨酸，Sigma 公司有售，－20℃ 保存。
18）*Eco*R I 甲基化酶（20 U/μl）：NEB Labs（Beverly.MA）或 Amersham Life Sciences 公司有售，－20℃ 保存。
19）10×连接酶缓冲液：200 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，150 mmol/L $MgCl_2$，100 mmol/L DTT，5 mmol/L ATP。－20℃ 保存。
20）磷酸化的 *Eco*R I 接头（150 pmol/μl）：NEB Labs 有售。－20℃ 保存。
21）T4 DNA 连接酶（400 U/μl）：NEB Labs 公司有售。－20℃ 保存。
22）10×*Eco*R I 缓冲液：500 mmol/L NaCl，100 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，100 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L DTT，－20℃ 保存。
23）*Eco*R I（20 U/μl）：NEB Labs 或 Amersham Life Sciences 公司有售。－20℃ 保存。

2.3 未掺入的接头的去除和 cDNA 大小的选择

24）精胺洗涤缓冲液：70% 乙醇，10 mmol/L $MgCl_2$，0.3 mol/L NaOAc、pH 7.0，4℃ 保存。
25）低熔点琼脂糖：FMC SeaPlaque 琼脂糖，Flowgen Bioscience（Sittingbourne，UK）公司有售。
26）50×TAE 缓冲液：2 mol/L Tris-醋酸盐，0.05 mol/L EDTA。
27）DNA 相对分子质量标准样品：0.5 μg 大小不等的 DNA 梯度片段溶于 5% 的甘油，内含 0.04% 溴酚蓝。NEB labs 有售。
28）STE：100 mmol/L NaCl，10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，1 mmol/L EDTA.

3. 方　　法

3.1 cDNA 合成反应

1）按表 24.1 中的次序混合第一条链合成所需的组分（参见注释 1）。
2）取出 1 μl 作掺入试验（参见注释 8）。加 1 μl 的 AMV 逆转录酶（参见注释 4），混合并于 42℃ 保温 60 min，置于冰浴中并再取 1 μl 作掺入测定。

表 24.1　第一条链合成混合物

10×第一条链合成缓冲液	2 μl
NaPPi	1 μl
HP RNase 抑制物	1 μl
10×dNTP 混合液	2 μl
寡聚 dT 或随机引物（参见注释 2）	1 μl
[α-^{32}P] dCTP	0.5 μl
polyA^{+}RNA（参见注释 3）	5 μl
H_2O	7.5 μl

3) 按表 24.2 混合第二条链合成所需的组分。12℃ 保温 60 min，然后 22℃ 保温 60 min，最后 70℃ 保温 10 min。

表 24.2　第二条链合成混合物

完成了第一条链反应的混合液	19 μl
2×第二条链合成缓冲液	50 μl
[α-^{32}P] dCTP	1 μl
RNase H	1 μl
DNA 聚合酶 I	6 μl
H_2O	23 μl

4）在微型离心机上离心几秒钟，然后置于冰上，再加 1 μl T4 DNA 聚合酶补平 cDNA 的末端。混合，于 37℃ 保温 10 min。

5）加 2 μl 的 0.5 mol/L EDTA、pH 8.0。置于冰上并取出 1 μl 作掺入测定。

6）用等体积的平衡酚/氯仿抽提两次，然后用等体积的饱和氯仿再抽提一次（参见注释 5）。

7）去除未掺入的核苷酸：加 100 μl 4 mol/L 醋酸铵和 200 μl 的无水乙醇，涡旋振荡后置于干冰上 15 min，然后让样品回温到 4℃，在微型离心机上 4℃ 离心 15 min，移去上清液并用冰冷的 70% 乙醇洗涤。再 4℃ 离心 5 min，移去上清液，空气干燥，然后再次溶在 10 μl 的 TE 中（参见注释 6）。

8）测定 cDNA 中放射性核苷酸的掺入量：将剩余的部分以 1 μl 的量分别点样在各张 DE-81 滤纸上且让其干燥，用 200 ml 的 0.5 mol/L Na_2HPO_4（pH 7.0）溶液洗 5 次，洗时要非常轻地转动，再用 200 ml 的 H_2O 洗 2～3 次直到清晰为止。最后用 100 ml 的甲醇洗涤并空气干燥。在闪烁计数器上用甲苯配制的闪烁液对滤膜计数，并计算^{32}P掺入量。

3.2　cDNA 末端加接 *EcoR* I 接头

1）cDNA 中的 *Eco*R I 位点的甲基化（参见注释 7）：加 4 μl 5×缓冲液 M，2 μl 10×缓冲液 SAM 和 3 μl H_2O 到 cDNA 中，混合后于微型离心机上离心几秒钟，加 1 μl *Eco*R I 甲基化酶，混合，于 37℃ 保温 60 min。

2）70℃ 保温 10 min 使甲基化酶失活，然后置于冰上。

3）将接头加接到 cDNA 末端：加 3 μl 10×连接酶缓冲液，2 μl 磷酸化的 *Eco*R I 接头，2 μl T4 DNA 连接酶和 3 μl H_2O。混合并于 12℃ 保温 16 h。

4）65℃ 加热 10 min 使连接酶失活后置于冰上。

5）酶切带有接头的 cDNA：加 9 μl 10×*Eco*R I 缓冲液，49.5 μl H_2O 和 1.5 μl *Eco*RI，混合后于 37℃ 保温 5 h，然后 70℃ 加热 10 min 使酶失活后置于冰浴中。

3.3 未掺入的接头的去除和 cDNA 的大小选择

1）加 5 μl 2 mol/L KCl 和 5μl 100 mmol/L 精胺到 90 μl 的已酶切的带有接头的 cDNA 反应体系中（参见注释 8），涡旋振荡后置于冰上 30min。

2）在 4℃ 微型离心机上离心 15 min，小心地移去上清液后加 1 ml 精胺洗涤缓冲液，置于冰上 30 min 后小心地移去上清液并再洗一次。

3）用 70％乙醇洗涤一次，空气干燥后将沉淀物溶于 9 μl 的 TE 中。

4）用含有 0.5 μg/ml EB 的 1×TAE 配制一个 1％低熔点琼脂糖凝胶，放在 4℃、30 min使凝胶凝固，在电泳槽中加 1×TAE 缓冲液到凝胶的高度，但不要浸没凝胶。

5）于 cDNA 样品中加 1 μl 50％的甘油，上样。若不加上样染料则较难上样，但在紫外线灯下较易看见少量的 DNA。在一邻近的泳道中上样含染料的 DNA 相对分子质量标准。

6）4℃ 中恒压电泳到溴酚蓝到达凝胶的中部为止，在长波紫外线灯(用长波的目的是使紫外线对 DNA 的损伤降到最低程度)下观察，并切下相当于大小在 700～7000 bp 之间的 cDNA 的一条凝胶。

7）如果此凝胶块较大，可能有利于浓缩 cDNA，将这块凝胶反向插入到另一低熔点凝胶中并同前次一样电泳，直到 cDNA 被浓缩在一窄带中。

8）每 100 mg 凝胶块加 400 μl STE。65℃ 保温 10 min，用等体积的平衡酚抽提一次，再用平衡的酚/氯仿抽提一次，最后用饱和氯仿抽提一次。吸液时避开分界面，其中含有白色琼脂糖粉末。

9）用 0.1 倍体积的 4 mol/L 醋酸铵和 2.5 倍体积的无水乙醇沉淀。置于冰上 30 min，4℃ 离心 30 min，再用 70％乙醇洗涤沉淀。

10）用 5μl TE 重悬沉淀物，取 0.5 μl 与已知浓度的相对分子质量标准样品一起在 1％的琼脂糖凝胶上电泳，以测定 cDNA 的大小和浓度。剩余的 cDNA 以 1 μl 等量分装后于 −70℃ 保存。保存的 cDNA 应能在几个月中保持稳定。

4．注　　释

（1）反应规模可放大到 cDNA 的大量合成。所有反应组分应在冰上轻轻混匀。

（2）寡聚－dT 或随机六核苷酸引物可用于 cDNA 合成，最常用的寡聚－dT 引物可复性到 mRNA 的 poly（A）$^+$ 尾上，这样产生的大部分是全长的 cDNA，尽管大的 mRNA 的 5′端的反转录将有所欠缺。随机引物常用于某种目的，如表达型文库的制备，

非常长的转录物的 5′端的富集，或者用来解决在用寡聚－dT 引物时因mRNA二级结构所产生的难题。

(3) 有时 mRNA 的二级结构影响 cDNA 的合成，这类问题可以通过在 cDNA 合成前将 polyA⁺ RNA 加热到 70℃、1 min 后立即置于冰上冷却而得以避免。

(4) AMV 和 MoMuLV 二者的逆转录酶都可用于 cDNA 的合成，AMV 逆转录酶由于只须用很少几个单位，故使用较为普遍。可是有报道认为在一定条件下用 MoMuLV 逆转录酶可以合成长达 10 kb 的 cDNA。

(5) 这一步及其随后各步中 cDNA 的回收可用手持式微型监测器监控，预计初始读数是 100～200 cps。

(6) 这个阶段的材料可保存在－20℃，建议在继续进行其他步骤前取一小部分双链 cDNA（0.5 μl）在 1%琼脂糖凝胶上电泳，用以指明 cDNA 产物的大小范围。

(7) 克隆的效率应首先用模拟 cDNA 来检测，而不应冒丢失珍贵的 cDNA 的风险。模拟 cDNA 应由类似于 cDNA 大小的平末端的磷酸化的片段组成。

(8) cDNA 的最大损失发生在精胺沉淀和凝胶纯化这两个步骤。这些损失是不可避免的，因为除去反应液中过多的短 cDNA 和所有痕量的未结合的接头是绝对必要的。在反应液中残留的少量接头分子的末端与连接到载体上的带有接头的 cDNA 的末端相比，前者的物质的量将大为超过后者。这将导致文库中大部分克隆不含有可检测的插入片段，即基本上是一个空文库。这一问题可以通过把胶纯化后对接上接头的 cDNA 再一次用精胺沉淀而得到解决。

参 考 文 献

1. Gubler, U. and Hoffman, B. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* **25,** 263–269.
2. Okayama, H. and Berg, P. (1982) High-efficiency cloning of full-length cDNA. *Mol. Cell. Biol.* **2,** 161–170.
3. Elledge, S. J., Mulligan, J. T., Ramer, S. W., Spottswood, M., and Davis, R. W. (1991) λYES: a multifunctional cDNA expression vector for the isolation of genes by complementation of yeast and *Escherichia coli* mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88,** 1731–1735.
4. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

第二十五章　cDNA 文库的构建

Michael M. Burrell

1. 引　　言

要获得一个 mRNA 的 cDNA 克隆，DNA 必须忠实地拷贝 mRNA，且 cDNA 文库必须大到足以代表目的 mRNA 所属的丰度类。例如 Goldberg[1] 已证明在烟草中全部 mRNA群体可分为三级，多数 mRNA（11 300）属于最低丰度类，占多核糖体 mRNA 的 39%。要想获得至少含有这个丰度类中每一种 mRNA 的一个克隆的 cDNA 文库，就需要约 2×10^5 个克隆[2]。使用构建双链 cDNA 的高效的 RNase H 方法[3]（参见第二十四章）以及把体外包装的噬菌体导入大肠杆菌的方法，只要用几微克的 mRNA 便可以实现这一目的。选择适当的 λ 载体非常重要，因为如果外源 DNA 的插入使该重组的 λ 基因组大于野生型长度的 105%，包装的噬菌体的生存力就会降低。

mRNA 分子的大小在几百个碱基到几千个碱基之间。适合这一长度的 DNA 的载体是 λgt10，因为它能接纳长达 7.6 kb 的 DNA 片段。如果目的 mRNA 接近或超出这一长度，那么应选择别的载体。

合理的克隆策略是当文库在进行平皿培养时亲本噬菌体应受到抑制。λgt10 可以完成这一任务，因为其亲本噬菌体是 $c\mathrm{I}^+$ imm^{434}，它在 *E. coli* 的 $\mathrm{hf1A}^{150}$菌株中（如 C600 hf1）受到有效的抑制。cDNA 插入该基因的 *Eco*R Ⅰ 位点产生 $c\mathrm{I}^-$ 表型，这些噬菌体能形成噬菌斑。在非 Cg1 菌株（如 C600）上，$c\mathrm{I}^+$ 产生表型混浊的噬菌斑，而 $c\mathrm{I}^-$ 则产生透明的噬菌斑。

如果想用抗体来筛选 cDNA 文库，则另一合适的载体是 λgt11。λgt11 作为表达型载体具有若干个有用的特征：*Eco*R Ⅰ 克隆位点处在 *lac*Z 基因的 3′端，一般认为它对所表达的蛋白质有稳定作用。λgt11 能接纳大到 7.2 kb 的插入片段，并产生一个温度敏感的溶菌阻遏物（cI857），该阻遏物在 42℃ 时失效，此外它包含一个琥珀突变 S100，该突变使噬菌体在不含抑制基因 SupF 的宿主中不能溶菌。这些特征于是可与带有对 *lacZ* 的表达具强烈阻遏作用的 pMC9 质粒的宿主细胞相结合。这类宿主细胞同时也是 *lon* 蛋白酶缺失的，这将使克隆和扩增过程中插入片段所编码的任一蛋白质的副作用降到最低程度。不过当用抗血清筛选时，利用 IPTG 灭活 *lac* 阻遏物仍可得到高水平的表达。

尽管用这些载体有许多优点，但在使用前有几点应该值得考虑。λgt10 长43.34 kb，因而一个 1 kb 的插入片段只是整个 DNA 的一小部分。这样，要获同样量的插入 DNA 的话，从选用的 λ 克隆中制备的 DNA 总量要比从选用的质粒克隆中制备的多得多。高效的克隆需要好的包装提取物，而要制备包装提取物很费事，不过好在它们也有商品出售。将克隆保持在 λgt10 和 λgt11 中并不可取，除非已经知道它们是稳定的。用抗体进行筛选似乎很好，但是需要能识别目的肽的特定的抗体，该目的肽是融合产物而未必以

其自然状态折叠。另外，许多正确的 cDNA 克隆被以错误的阅读框插入到 λgt11 中，因此不能产生正确的蛋白质。

λZAP（Stratagene 公司生产）是另一 λ 载体，它被设计来简化筛选后 cDNA 插入片段的亚克隆[4]。该载体含有 Bluescript 质粒，所以当细胞被 f1 辅助噬菌体超感染后，质粒便被切割并以共价闭合单链环的形式进行包装。包装的“噬粒”（phagemid）可用来感染新的宿主并在宿主中像 Bluescript 质粒一样复制。在文库构建中，cDNA 被克隆到 Bluescript 多克隆片段中，所以 λZAP 有众多的克隆位点可供克隆，且可像 λgt11 一样能利用蓝白斑选择。该载体也可以用来构成表达型文库。本章叙述 λgt10 和 λgt11 文库的构建，这些方法同样适用于 λZAP，但读者应根据制造商的建议作适当的更改。

用 λgt10 或 λgt11 构建 cDNA 文库过程中有许多步骤。本章从 λgt10 与 λgt11 的培养和噬菌体载体 DNA 的制备的方法开始，随后介绍由载体 DNA 制备 λ 臂的方法和 cDNA 连接到这些臂上的方法。因此，这里假定读者有已制备好的合适的 cDNA（参见第二十四章）。本章最后介绍将 DNA 包装成为活的噬菌体并感染 *E. coli* 形成文库的方法。下面介绍的操作程序在我们这里做得很顺利。可能还有其他的方法和变化同样也能成功。至于更深层次的内容，读者可查阅 Glover[5]和 Sambrook 等[2]的著作。

2. 材料（参见注释 1）

酶可以购得，这些酶可与随之提供的缓冲液一起使用，不过在某些情况下，正如参考文献[6]所指出的，用自己配制的缓冲液更合适。

2.1 供 λgt10 或 λgt11 感染的宿主细菌的制备

1）L-肉汤培养基：总量 1 L 中加 10 g 细菌培养用胰蛋白胨，5 g 细菌培养用酵母提取物，10 g NaCl，调 pH 值到 7.5。
2）底层琼脂：L-肉汤培养基中加 1.5% 的琼脂，高压灭菌后保存。
3）20% 麦芽糖：高压灭菌，室温保存。
4）宿主细菌：
λgt10 的宿主细菌：
C600(F^-, e14$^-$, [McrA$^-$], *thr*-1, *leu*B6, *thi*$^-$, *lac*Y1, *sup*E44, *rfl*bD1, *fhu*A21)；或 Bnn93(F^-, e14$^-$, [McrA$^-$], *hsd*R [$r_k^- m_k^+$], *thr*-1, *leu*B6, *thi*$^-$, *lac*Y1, *sup*E44, *fhu*A21, *mcr*B)；或 C600 *hfl*。
λgt11 的宿主细菌：
Y1088(F^-, δ*lac*U169, *sup*E, *sup*F, *hsd*R [$r_k^- m_k^+$], *met*, *trp*R, *fhu*A21, *pro*C∷Tn5 [pMC9; *tet*^{r}, *amp*^{r}])；或 Y1089(F^-, Δ*lac*U169, *lon*-100, *ara*D139, *str*A, *hfl*A^{150}, *pro*C∷Tn10 [pMC9; *ter*^{r}, *amp*^{r}])；或 Y1090(F^-, Δ*lac*U169, *lon*-100, *ara*D139, *rps*1[Str^r]*sup*F, *mcr* A, *trp*C22 ∷Tn10 [pMC9; *tet*^{r}, *amp*^{r}])。
λZAP 的宿主细菌：
XL-1 blue（F^-，*pro*AB$^+$，*lac*I^q *lac*Z ΔM15，*sup*E，*hsd*R）。

5）10 mmol/L $MgSO_4$：高压灭菌，室温保存。

2.2 λgt10 原种的效价测定和噬菌斑纯化

6）λ载体：整个 DNA 或制备好的λ臂都有商品出售，3.2～3.6 小节介绍λ臂的制备。

7）λ稀释剂：10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，10 mmol/L $MgCl_2$，0.1 mmol/L EDTA。

8）上层琼脂：L-肉汤培养基中加 0.7%的琼脂，高压灭菌后贮存。注意 λDNA 纯化时用琼脂糖代替琼脂。

9）氯仿：供细菌裂解用的氯仿应尽可能新鲜，否则会导致λ噬菌体失活。

2.3 λgt10 和 λgt11DNA 的制备

10）甲酰胺：甲酰胺的质量要好，确保其纯度很高，否则通过重结晶使其纯化。

11）T_5E：10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，5 mmol/L EDTA。

12）TE：10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，1 mmol/L EDTA。

2.4 λ的 *Eco*RⅠ酶切

13）适当的限制性内切酶和缓冲液：就 λgt10 和 λgt11 来说，*Eco*RⅠ是克隆所常用的，至于其他的λ载体，别的限制性内切酶可能更适合。酶的使用见参考文献 6。

14）0.5 mol/L EDTA：调 pH 值至 8.0 以利于溶解，高压灭菌。

15）酚：用 100 mmol/L Tris-HCl 平衡的重蒸酚。

16）氯仿/丁醇：50∶1 的氯仿/丁醇混合液。

17）4 mol/L 醋酸铵、pH 7.5。

2.5 λ的磷酸酶解

18）10×CIP 缓冲液：0.5 mol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA、pH 8.5。

19）CIP：小牛肠碱性磷酸酯酶（Boehringer），4℃保存，CIP 较细菌碱性磷酸酯酶不易被核酸酶污染。

2.6 cDNA 和载体的连接

20）10×连接缓冲液：0.5 mol/L Tris-HCl、pH 7.5，1 mol/L $MgCl_2$，100 mmol/L DTT。－20℃保存。

21）1 mmol/L 亚精胺：加热到 80℃、10 min，－20℃保存。

22）5 mmol/L ATP：－20℃保存。

23）T4 DNA 连接酶：－20℃保存。

2.7 体外包装

24）包装混合物：可购得或实验室自制（参见第二十二章）。

2.8 供选择用λ文库的平皿培养

25）X-gal：2%5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷溶于二甲基甲酰胺中，于-20℃保存。

26）1 mol/L 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷（isopropylthiogalactoside，IPTG）溶于灭菌蒸馏水中，于-20℃保存。

3. 方　　法

本节假定实验者已制备了准备插入 *Eco*R I 位点的双链 cDNA。

3.1 宿主细菌的制备

1）在含有0.2%麦芽糖的L-肉汤培养基平皿上划种所需 *E. coli* 菌株（见下面适当菌株的选择），37℃培养过夜。

2）在含有 50 ml L-肉汤培养基和0.2%麦芽糖的 250 ml 三角烧瓶中接种单个菌落，37℃振荡培养（220 r/min）过夜，避免泡沫产生。

3）取 40 ml 的培养细胞，3000 *g* 离心 10 min。

4）在 4℃中用 20 ml 10 mmol/L $MgSO_4$ 重悬浮细胞（参见注释 2）。

5）用 10 mmol/L $MgSO_4$ 将 OD_{600}调到 2.0。

3.2 λgt10 原种的效价测定和噬菌斑纯化

为要高效地制备供克隆用的优质的 λgt10 DNA，首先须测定噬菌体原种的效价，并检查原种中是否被形成透明噬菌斑的突变型所污染，这种突变型的存在会使后面筛选文库的工作复杂化。

1）将0.1ml λ稀释液中的噬菌体和0.1 ml的平皿培养宿主细胞（C600）一起于 37℃培养 20 min 以测噬菌体原种的效价，培养时轻轻摇动。

2）加 3 ml 顶层琼脂，转动混合后倒在补充有0.2%麦芽糖的L平皿上（参见注释 3）。

3）37℃培养过夜。

4）如有透明的噬菌斑出现，用灭菌的细滴管或毛细管将一混浊噬菌斑转移到含有 1 ml λ稀释液的 Eppendorf 管中，加一滴（50～100 μl）氯仿终止细菌生长，如果马上要用，室温放置 1 h，否则 4℃过夜。

5）假定噬菌体数为 10^6 个，连续稀释以测定效价。

6) 如有透明的噬菌斑出现。则重复第 4 步。
7) 当没有透明噬菌斑出现时，以 2000 噬菌斑生成单位(plaque forming unit, pfu)/82 mm 平皿进行培养，观察在 15 000 个噬菌斑中是否存在透明的噬菌斑。
8) 如多于一个透明的噬菌斑/10^4 则继续纯化，直到克隆非常纯且稳定为止。

3.3 λgt10 DNA 的制备

1) 准备充足的用于制备 DNA 的噬菌体原种，以 1×10^6 pfu/皿接种 15～30 个 82 mm 平皿（参见注释 4)。
2) 制备新鲜的平皿培养宿主细菌（C600)：倒 15～30 个 L-肉汤培养基+0.2%葡萄糖的平皿（参见注释 5)。在 3 ml 的上层琼脂中加 0.1 ml 宿主细菌和 1×10^6 噬菌体。作为对照，一个皿中不加 λgt10，另一个皿中不加 λ 和细菌。也可用较大的平皿，但操作前须多加练习。
3) 37℃ 中培养 4～6 h 后平皿将显露出斑点，如果值得怀疑，则不宜培养太久，否则效价会降低；如平皿一片混浊则说明培养过头。
4) 4℃ 中或于冰上冷却 30 min，加上 4.5 ml 冰冷的 λ 稀释液和几滴氯仿（用滴管)，4℃ 过夜以便噬菌体扩散到 λ 稀释液中。
5) 小心地将平皿中的 λ 稀释液转移到聚丙烯离心管中，不要弄碎上层琼脂。
6) 10 000 *g* 离心 20 min 以沉淀细胞和琼脂，将上清液小心地转移到适合于甩平式转子的洁净的离心管中。
7) 70 000 *g* 离心 90 min。
8) 用 5 ml λ 稀释液重新悬浮噬菌体沉淀，加 8.5 g CsCl，再用 14 ml 密度为 1.47 g/ml 的 CsCl 在上面铺加。用 Beckman 70Ti 转子以 5000 r/min（184 000 *g*）离心过夜，慢慢地加速。在最后 40 min 中将速度降低到 40 000 r/min（见注释 6)。
9) 吸取稍带蓝色的白色噬菌体条带，吸取的体积越小越好，再加至少是等体积的含有密度为 1.5 g/ml 的 CsCl 的 λ 稀释液至 4 ml。在 Kontron 80.4Ti 转子上以 60 000 r/min离心 4 h。
10) 以尽可能小的体积吸取噬菌体带，加 λ 稀释液到 1 ml。
11) 加 1 ml 甲酰胺，混合后室温静置 2 h。
12) 加 1 ml SDW 和 6 ml 无水乙醇，DNA 应立即得以沉淀。
13) 在台式离心机上稍作离心后吸去上清液。
14) 用 T_5E 重新溶解 DNA，并再用乙醇沉淀两次（参见注释 7)。
15) 最后，将 DNA 溶于 TE 缓冲液中。

3.4 λgt11 DNA 的制备

λgt11 DNA 制备的前几步不同于上述制备 λgt10 DNA 的方法，因为在这里可以利用温度敏感的溶菌阻遏这一特性。例如可首先在 32℃ 中增殖细胞，然后在 44℃ 中诱导溶菌。

1）将 Y1088 和 λgt11 混合，于 32℃和 42℃进行平皿培养以验证仅在 42℃时发生裂解。
2）将一单菌落中的细菌接种在含有 10 ml L-肉汤培养基 + 10 mmol/L $MgCl_2$ 的 McCartney 瓶中，转动，拧松瓶盖于 32℃培养过夜。
3）取 10 ml 过夜培养物加入到含 1 L 已预热到 32℃的 L-肉汤培养基的 3 L 三角烧瓶中，于旋转式摇床上在 32℃中以 280 r/min 培养至 $OD_{600} = 0.6$（2～3 h）。
4）在烧瓶中放置一灭过菌的温度计，并在 60℃的水浴中旋转烧瓶，直到烧瓶内培养液温度达 44℃为止，然后于 44℃中充分通气培养 15 min。
5）在 37℃中充分通气培养 3 h。(温度不可以降到 37℃以下，否则将很少有裂解)。
6）将约 2 ml 的培养液和几滴氯仿混合于一小试管中以便检查裂解情况，培养液应在 3～5 min内变清。
7）加 10 ml 氯仿到培养液中并于 37℃振荡 10 min。
8）在 6×300 ml 转子（MSE. 21 或同类转子）上，用带螺旋盖的聚丙烯离心瓶以 5000 r/min（300 *g*）在 4℃中离心 10 min 将细菌碎片沉淀。
9）10 000 r/min（15 500 *g*）离心过夜以沉淀噬菌体并按 3.3 小节中步骤 8 继续处理(参见注释 8)。

3.5 λ的 *Eco*RⅠ酶切

这一步和下一步涉及 λgt10 和 λgt11 臂的制备，从而使 cDNA 能连接到它们的两臂之间。两个载体都仅有一个 *Eco*RⅠ位点。在 λgt10 中此位点在 *c*Ⅰ基因中，外源 DNA 的插入将产生 cI^- 表型（透明噬菌斑）；在 λgt11 中此位点位于 *lac*Z 基因中。因而，当 λgt11 噬菌体在含有 X-gal 的培养基的平皿上培养时，带有插入片段的噬菌体将形成白色的噬菌斑，而野生型噬菌体将则形成蓝色噬菌斑。

1）在 100 μl 的总体积中混合下列物质：10 μg DNA，10 μl 10× *Eco*RⅠ缓冲液和灭菌蒸馏水，要考虑到第 3 步中第一次加入 30 U 酶的体积。
2）离心使液体集中到管底。
3）加 30 U 的 *Eco*RⅠ，体积要<20 μl。
4）混匀后 37℃保温 2 h。
5）加 30 U *Eco*RⅠ并再保温 30 min。
6）加 2 μl 0.5 mol/L EDTA。
7）加50 μl 酚以去除蛋白质，轻轻混匀(不用涡旋振荡，参见注释7)。加50 μl 氯仿/正丁醇(50:1)。
8）离心并吸取水相。
9）加等体积的 10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，回抽酚/氯仿层。
10）氯仿（用氯仿/正丁醇，50:1）抽提合并的水相。
11）加 2.5 倍体积的乙醇和 1/40 总体积的 4 mol/L 醋酸铵，于 -20℃沉淀。

3.6 λ的磷酸酶解

严格说来，对 λgt10 来说这一步并非必要，我们之所以要这样做，是因为它对结果不但没有害处而且还会使 C600 上的 cDNA 克隆更易检测。

1) 在 180 μl 的水中重新悬浮已酶切的 λ 载体，加 20 μl 10×CIP 缓冲液。
2) 加 0.1 U 的 CIP，于 37℃ 保温 15 min。
3) 加 2.5 μl 的 0.5 mol/L EDTA，混匀后加热到 56℃ 保温 10 min。
4) 用 125 μl 的酚抽提，混匀，再加 125 μl 氯仿/正丁醇（50∶1），轻轻混匀后于 37℃ 保温 10 min。
5) 按上面的方法重抽水相。
6) 用 125 μl TE 缓冲液回抽有机相，37℃ 保温 10 min。
7) 与水相合并。
8) 用氯仿/正丁醇（50∶1）抽提两次。
9) 在 -20℃ 中用 2.5 倍体积的无水乙醇和 1/40 总体积的 4 mol/L 醋酸铵沉淀，几分钟后 DNA 即将沉淀。

3.7 cDNA 和载体的连接

重要的是要能确定在包装和感染这两步以后的哪一步的效果还不够理想，为此要进行下列连接反应作为对照。

① 未酶切的 λ。

② *Eco*R Ⅰ 酶切的、未磷酸酶解的 λ。

③ *Eco*R Ⅰ 酶切的、磷酸酶解的 λ。

④ *Eco*R Ⅰ 酶切的、未磷酸酶解的 λ，加 *Eco*R Ⅰ 酶切的 2～3 kb 的测试 DNA。

⑤ *Eco*R Ⅰ 酶切的、未磷酸酶解的 λ，加 cDNA（参见注释 9）。

1) 适当量的 cDNA 与 1 μg 适当的载体混合。同时设连接的对照组。用水补足至 90 μl，加 10 μl 2 mol/L NaCl，混匀并加 2.1 倍体积的乙醇，冷却。
2) 在 4℃ 中离心 20 min 以沉淀 cDNA 和载体，小心地倒去上面的乙醇。
3) 用 0.5 ml 的乙醇（预冷到 -20℃）洗涤沉淀。在微量离心机上离心 5 min。
4) 去除乙醇，再用乙醇（预冷到 -20℃）洗一次。将沉淀冷冻干燥 5～10 min。
5) 用 3 μl 的灭菌双蒸水溶解沉淀。加1 μl 混合液（5 μl 10×连接缓冲液 + 5 μl 1 mmol/L 亚精胺）。
6) 65℃ 加热 5 min，于微型离心机上离心 30 s。
7) 于 46℃ 保温 20 min。
8) 加 0.5 μl 5 mmol/L rATP 和 1.0 μl 的 T4 DNA 连接酶，充分混匀但不用涡旋振荡，离心 30 s。
9) 于 12℃ 保温 24 h。

3.8 体外包装

要以极少量的 cDNA 建立大的 cDNA 文库，就必须进行好连接有 DNA 插入片段的噬菌体的包装。可是，新手通常不能进行有效的包装，因此，在作 cDNA 包装之前总是先用一些对照 DNA 来检验包装提取物。我们使用的包装过程与第二十二章介绍的稍有不同。

1）加 5 μl 超声处理的提取物到 DNA 中，用吸管头混匀。
2）置于冰上 15 min。
3）加 10 μl 刚融化的冻融溶菌产物。
4）室温培养 1 h。
5）加 180 μl λ 稀释液并混匀。
6）如果不立即进行平皿培养，加一滴氯仿后 4℃ 保存。

3.9 供筛选用的 λ 文库的平皿培养

在开始大规模的文库筛选之前，必须先确定文库的效价（即一定数量的包装好的 λ 文库所产生的噬菌斑数）。

1）稀释 1% 包装好的 λ 文库到 0.1 ml λ 稀释液中，加 0.1 ml 宿主细菌（λgt10 用 C600，λgt11 用 Y1088，λZAP 用 XL－1 blue），37℃ 轻摇培养 20 min。
2）培养期间，熔化足够的供平皿培养用的上层琼脂并冷却到 47℃。
3）培养结束时加 3 ml 上层琼脂，转动混匀后倒在补充有 0.2% 麦芽糖的 L－肉汤平皿（参见注释 3）上。对于 λgt11 和 λZAP 须用刚刚混合的 40 μl X-gal 与 20 μl IPTG 补充到上层琼脂中。
4）倒置平皿，37℃ 培养过夜。
5）统计噬菌斑数以确定文库效价。对于 λgt10 根据透明噬菌斑数确定重组噬菌斑（即含有插入片段）的百分比，对于 λgt11 和 λZAP 则根据白色噬菌斑进行计算（参见注释 10）。
6）扩大规模，平皿培养足够的噬菌体以筛选所需的 cDNA（参见注释 11～14）。记住应在 C600 *hfl* 细胞上培养 λgt11。

4. 注　　释

（1）用于核酸工作的所有溶液都应灭菌，并保证没有核酸酶。除特别指明外，溶液都在室温保存。所有玻璃和塑料器皿都应硅化。
（2）重新悬浮细菌时，起初总是用小体积的液体，当出现乳浆状时，再加剩下的重悬浮液体。
（3）平皿培养噬菌体时，用充分干燥的或保藏两天的平皿。当加上层琼脂和噬菌体时，上层琼脂温度应为 45～50℃，依次操作每个样品，避免产生气泡，并将平皿放在

水平的工作台上 30 min。培养时平皿应倒置。

(4) λgt10 可从溶菌液中制备，但不能识别出噬菌体的 cI^- 回复突变型，从而使对带有插入片段噬菌体的确定容易出错。

(5) 制备 λgt10 DNA 时，L-肉汤培养基平皿中的葡萄糖可使效价增加 10 倍。

(6) 关于这个梯度的背景知识参看参考文献 7。

(7) 处理高相对分子质量的 DNA 动作要轻，避免产生剪切力，否则 DNA 容易降解。

(8) 如果不具备适用于过夜离心的离心机，可用聚乙二醇（PEG）沉淀噬菌体。于室温的 250 ml 上清液中加 15 g NaCl，25 g PEG-6000，1.5 ml 10 mg/ml 的 RNase A 和 1 mg/ml 的 DNase I。4℃ 中搅拌至少 3 h，最好是过夜。然后 10 000 r/min 离心 30 min 以收集噬菌体。再次悬浮于 5 ml 的 λ 稀释液中，并加氯仿于室温抽提除去 PEG。可是，作者发现用此方法回收噬菌体似乎结果不很稳定。

(9) 所用的 cDNA 量完全取决于它的长度和质量。1～5 ng 的 cDNA 已可用来构建大的文库。

(10) 不要扩增多于所需要的量，因为即使没有 IPTG，噬菌斑大小的变化也相当大。记住用 50 μg/μl 的氨苄青霉素以维持产生阻遏物的质粒。

(11) 含有 β-半乳糖苷酶融合蛋白的 λgt11 和 λZAP 的噬菌斑可能呈现淡蓝色。

(12) 所需噬菌斑的数量依赖于 cDNA 在整个文库中的可能的丰度，范围大约应为 $10^4 \sim 5\times10^5$。

(13) λgt10 的大噬菌斑意味着在一个 82 mm 的平皿上仅约有 1000 个噬菌斑可供筛选，宿主细菌密度增加一倍时噬菌斑便缩小，这将有利于大文库的筛选。随着 λgt10 数的增加，6 h 后就可进行筛选而不需过夜。

(14) 平皿培养筛选 λgtll 和 λZAP 文库时，省去 X-gal 和 IPTG。

参 考 文 献

1. Goldberg, R. B., Hoschek, G., and Kamalay, J. C. (1978) Sequence complexity of nuclear and polysomal RNA in leaves of the tobacco plant. *Cell* **14,** 123–131.
2. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1982) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual,* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, Harbor, NY.
3. Gubler, E. and Hoffman, B. J. (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene* **25,** 263–269.
4. Short, J. M., Fernandez, J. M., Sorge, J. A., and Huse, W. D. (1988) Lambda ZAP: a bacteriophage lambda expression vector with in vivo excision properties. *Nucleic Acids Res.* **16,** 7583–7600.
5. Glover, D. M. (1985) *DNA Cloning, vol. 1: A Practical Approach,* IRL, Oxford, UK.
6. Burrell, M. M. (1993) *Enzymes of Molecular Biology. Methods in Molecular Biology,* vol. 16. Humana, Totowa, NJ.
7. Garger, S. J., Griffith, O. M., and Grill, L. K. (1983) Rapid purification of plasmid DNA by a single centrifugation in a two step cesium chloride-ethidium bromide gradient. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **117,** 835–842.

第二十六章　λ 文库的筛选

Janet C. Harwood, Adrian J. Harwood

1. 引　　言

前面几章介绍了基因组和 cDNA 的 λ 文库的构建。本章我们介绍筛选文库的两种方法。第一种方法是通过序列同源性原理进行筛选，适用于筛选基因组文库和 cDNA 文库。具体方法是：先用平皿培养文库，然后在平皿上覆盖一张如硝化纤维素之类的膜，将文库影印在膜上。将每一噬菌斑内重组 λ 噬菌体 DNA 变性并固定到膜上。这样，原始平皿上的噬菌斑的位置在膜上得以准确地表示，然后用标记核酸杂交以鉴定特定的克隆，将杂交产生的放射自显影片与琼脂平皿相比就可以分离出阳性克隆。通过连续的平皿培养和杂交便能纯化克隆。

筛选 λ 文库的第二种方法是通过蛋白质表达而进行的。具体方法是：将 cDNA 克隆在 λ 表达型载体如 λgt11 上[1,2]。再将表达型文库进行平皿培养并诱导蛋白表达，最后转移到膜上。最常用的筛选方法是用表达蛋白的抗体（免疫筛选），但也可用蛋白质:DNA，蛋白质:蛋白质，甚至蛋白质:配体的相互作用进行筛选[3,4]。最简单的免疫筛选法是用 ^{125}I 直接标记一级抗体。然而，放射性标记的抗体易产生高的背景而且具有较大的公害，同时未必比现有的酶法更灵敏。多数方法是使用结合有一种酶，如辣根过氧化物酶（HRP）或碱性磷酸酯酶（AP）的二级抗体，对于这些酶都有非常灵敏的检测方法。酶促检测的另一优点是可以在膜上直接产生出信号，使得与噬菌斑对齐比较更为准确。最灵敏的免疫筛选法是用抗生物素蛋白-生物素检测系统[5,6]，这种检测系统的生物学基础是四分子的生物素非常牢固地结合到一分子的抗生物素蛋白上，使检测系统具有放大能力，从而提高系统的灵敏度。通过生物素标记的二级抗体与生物素标记的 HRP 和抗生物素蛋白复合体之间的反应可达到最大程度的放大[7]。

本章我们介绍供核酸杂交和免疫筛选用的影印膜的制备方法，同时也介绍用二级抗体的简单免疫筛选的方法。最后，我们还介绍小规模 λ DNA 制备（小量制备）的方法，这种方法能制备可供限制性内切酶酶切的高质量的 DNA。

2. 材　　料

2.1　噬菌斑杂交

1）硝化纤维素膜（参见注释 1）：每个被筛选的平皿需要两张膜，硝化纤维素膜不必灭菌（参见注释 2）。

2）3 MM 滤纸（Whatman, Maidstone, UK）：切成比膜稍大的尺寸。

3）变性液：1.5 mol/L NaCl，0.5 mol/L NaOH，此溶液应现配。

4）中和液：1.5 mol/L NaCl，0.5 mol/L Tris-HCl、pH 7.0。

5）20×SSC：3 mol/L NaCl，0.3 mol/L 柠檬酸钠、pH 7.4。用去离子水稀释成为 3×SSC 工作溶液。

6）SM 缓冲液：1 L 中含 5.8 g NaCl，2 g $MgSO_4 \cdot 2H_2O$，50 ml 的 1 mol/L Tris-HCl、pH 7.5，和 5 ml 2% 明胶。高压灭菌，室温保存。

2.2 筛选表达型文库

7）IPTG：配制 10 mmol/L 异丙基硫代-β-D-半乳糖苷溶液以 50 ml 分装，-20℃保存。

8）TBS：20 mmol/L Tris-HCl，137 mmol/L NaCl、pH 7.6。

9）TBST：20 mmol/L Tris-HCl，137 mmol/L NaCl、pH 7.6，0.1% Tween 20。

10）TBST 封阻剂：在 TBST 中加 3%BSA（组分 V：Sigma [St.Louis，Mo] A4503）。

11）抗体：在筛选前应通过 Western 印迹测定抗体的效价，以确证它有较强的信号(检测50 pg 变性蛋白)及低的本底[8]。文库筛选时，用产生可接受的本底的最高稀释度。二级抗体应与适当的检测系统相结合，例如，放射性标记，或结合到 HRP 或 AP 上。如果一级抗体是 IgG，可用蛋白 A 代替二级抗体。一级抗体溶液可在 0.02%叠氮化钠中保存于 4℃，并且可反复使用几次。

12）检测试剂：应使用适当的检测系统。用一种有效的直接对膜进行染色的显色法来检测 AP，所用染色液是 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸(BCIP)和氮兰四唑(NBT;8)。制备膜拷贝的方法见第 7.8 和十章。

2.3 二级和三级筛选

13）L-肉汤养基：1 L 中溶解 10 g 细菌培养用的胰蛋白胨，5 g 酵母提取物和 5 g NaCl，调 pH 值到 7.2，高压灭菌。要培养 λ 则加 $MgSO_4$ 至终浓度为 10 mmol/L。

14）上层琼脂：在 1 L 补充有 10 mmol/L $MgSO_4$ 的 L-肉汤培养基中加 7 g 细菌培养用琼脂，高压灭菌。

15）L-琼脂：在 1 L 补充有 10 mmol/L $MgSO_4$ 的 L-肉汤培养基中加 15 g 细菌培养用琼脂，高压灭菌。

16）宿主细菌：适当菌株的新鲜培养物（参见注释 3)。

17）TM：10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，10 mmol/L $MgSO_4$。

2.4 λ 噬菌体的小量制备

18）RNase A：10 mg/ml 溶于去离子水中，-20℃保存。

19）DNase A：1 mg/ml 溶于去离子水中，-20℃保存。

20）20%PEG/2 mol/L NaCl：于 TM 中配制，高压灭菌，室温保存。

21）去离子水配制的 10% SDS（w/v），室温保存。
22）0.5 mol/L EDTA：调 pH 值到 8.0 使溶解，高压灭菌，室温保存。
23）蛋白酶 K：10 mg/ml 的溶液，−20℃保存。
24）酚/氯仿：酚与氯仿 1∶1 的混合液。酚用 pH 8.0 的 Tris-HCl 平衡。
25）氯仿。
26）醋酸钠：3 mol/L 醋酸钠、pH 5.2，高压灭菌，室温保存。
27）乙醇：无水和 70%（v/v）两种贮存液。
28）10×凝胶加样缓冲液：50%甘油，0.5% SDS，10 mmol/L EDTA，0.25%溴酚蓝，0.25%二甲苯青。

3. 方　　法

在制备影印膜之前，按第二十二和二十五章中介绍的方法平皿培养 λ 文库。

3.1 噬菌斑杂交

1）在覆盖硝酸纤维素膜前使平皿于 4℃ 中冷却至少 1 h。
2）小心地在每一平皿上放一张膜，注意在膜与琼脂之间不要形成气泡，膜在平皿上放置 3 min。
3）用 19 号针头在膜的四角刺孔深入琼脂中以标志四个角（参见注释 4），用笔在平皿的底上画一小“×”，以标明琼脂中孔的位置。取出每张膜并做上标记（参见注释 5）。
4）立即在平皿上放置另一张膜，放 5 min 以制作第二张（副本）影印膜。用针尖以与第一次同样的方式标记该副本膜，这样，在杂交后可把两张放射自显影片加以排齐比较。(参见注释 6)。将平皿倒置保存在 4℃ 中。
5）将每张膜转移到一张浸在变性溶液中的 3 MM 滤纸上，噬菌斑一面朝上，放置 5 min。
6）将膜在盛有中和溶液的浅盘中漂洗 5 min。
7）取出膜，在 3×SSC 中漂洗 2 min。
8）于 3 MM 滤纸上吸干膜并于 80℃ 中烘 1 h。
9）用第 6 章中介绍的核酸探针进行杂交。重要的是在自显影前要在膜的周围标上适当的方位标志，使放射自显影照片与膜得以准确对齐。
10）在放射自显影片上标明针孔的位置，并与副本对齐，阳性噬菌斑将在两张放射自显影片上都出现（参见注释 7），通过针孔可使放射自显影片和平皿对齐。
11）用宽嘴的滴管取出比阳性噬菌斑稍大的琼脂块以挑取阳性噬菌斑。在进行第二次筛选前将琼脂块挤入 1 ml SM 缓冲液中，并在室温中浸泡 2 h 或 4℃ 过夜，（参见 3.3 小节）。

这项技术作适当改变后可用于筛选细菌菌落，例如可从质粒文库和黏粒文库（参见

注释 8）及 M13 噬菌体克隆（参见注释 9）中筛选细菌菌落。

3.2 筛选表达型文库

1）将表达型文库与适当的宿主一起接种平皿，并将这些平皿于 42℃ 培养 3～4 h（参见注释 10）。
2）将所需数量的硝酸纤维素膜浸在 10 mmol/L IPTG 中，使用前室温中于 cling film 上干燥几小时。
3）当噬菌斑已长到适当大小时（参见注释 11）放上第一张膜并将平皿放在 37℃ 中至少培养 4 h（参见注释 12）。
4）标出所有膜的四角并从平皿中取出膜（参见 3.1 节），立即放到 TBS 中。
5）放上第二张膜，将平皿放在 37℃ 中培养 3 h。
6）每张膜在 TBS 中洗 5 min，重复一次，然后在 TBST-封阻剂中室温放置至少 1 h，也可在 4℃ 中保温过夜。
7）按下列顺序洗膜：先用 TBST 冲洗 2 次，再用 TBST 洗 15 min，最后用 TBST 洗两次，每次 5 min。
8）加一级抗体并置于振荡平台上，在室温中摇 1～4 h 或 4℃ 摇动过夜。
9）用 TBST 洗膜，第一次洗 15 min，第二、三次各洗 5 min（参见注释 13）。然后加二级抗体并置于振荡平台上，室温中摇 1 h。
10）从二级抗体中取出膜并按下列顺序洗膜：先用 TBST 冲洗两次，再用 TBST 漂洗 15 min，最后用 TBST 漂洗两次，每次 5 min。
11）使用适当的检测系统，并将已处理好的膜或显影了的胶片与文库平皿对齐，并按 3.1 节第 11 步的方法挑取阳性噬菌斑。

3.3 第二和第三级筛选

1）将每一浸泡含噬菌斑的琼脂块的 SM 缓冲液作下列稀释：
   10 μl 加到 1 ml 的 SM 中（10^{-2}稀释度）
   100 μl 的 10^{-2}稀释液加到 1 ml 的 SM 中（10^{-3}稀释度）
   100 μl 的 10^{-3}稀释液加到 1 ml 的 SM 中（10^{-4}稀释度）
   100 μl 的 10^{-4}稀释液加到 1 ml 的 SM 中（10^{-5}稀释度）
2）分别加 10 μl 的 10^{-3}，10^{-4}和 10^{-5}稀溶液到 0.3 ml 的宿主细菌和 3 ml 50℃ 中保温的已融化的上层琼脂中，将每个混合液分别倒平皿并保温过夜，这样，这些平皿上噬菌体的稀释度就分别是 SM 噬菌体原液的 10^{-5}，10^{-6}和 10^{-7}。
3）按 3.1 小节的方法再次筛选，同样挑取阳性噬菌斑的琼脂块到 SM 中。
4）假定效价为 10^7 噬菌斑/ml，作下列稀释[1]：
   10 μl 加到 1 ml 的 SM 中（10^{-2}稀释度）

1）原文稀释有误，已予订正。——译者注

100 μl 10^{-2}稀释液加到 1 ml 的 SM 中（10^{-3}稀释度）

100 μl 10^{-3}稀释液加到 1 ml 的 SM 中（10^{-4}稀释度）

分别加 10 μl 的 10^{-2}，10^{-3}和 10^{-4}稀释液到 0.3 ml 宿主细菌和 3 ml 50℃中保温的已熔化的上层琼脂中，平皿培养每一混合液并保温过夜。结果应分别产生 1000，100 和 10 个噬菌斑。

5）按 3.1 节方法再次筛选并挑取含阳性噬菌斑的琼脂块到 SM 中。

6）以培养皿上的溶菌产物形式保存阳性噬菌体。为此，在 9 cm 直径的平皿上可培养 10^5 个噬菌体（约 10 μl 的三级筛选原液）。操作方法像前面一样，并于 37℃ 培养过夜。整个菌苔应被溶菌。

7）加 5 ml TM，并于室温中缓慢地摇 2 h，或 4℃ 摇过夜。

8）用吸管将 TM 转移到离心管中，4℃ 中 4000 *g* 离心 10 min。吸取上清液，加入一滴氯仿，并于 4℃ 保存。

3.4 λ噬菌体的小量制备

1）制备平皿溶菌产物，除在平皿中用琼脂糖代替琼脂外，其余同 3.3 节，第 5 步（参见注释 14）。将 5 ml TM 加在平皿上，于室温缓慢振荡 2 h 或 4℃ 振荡过夜。

2）用吸管将 TM 转移到离心管中，再用 1.5 ml TM 洗平皿，合并于离心管中，在 4℃ 中以 4000 *g* 离心 10 min。

3）吸取上清液，加 2 μl RNase 和 2 μl DNase，37℃ 保温 30 min。

4）加等体积的 20% 的 PEG/2 mol/L NaCl，置于冰上 2 h。

5）在 4℃ 中以 10 000 *g* 离心 10 min。轻轻地倒出上清液，用卷筒纸尽可能吸干管壁。

6）用 0.5 ml 的 TM 重新悬浮噬菌体沉淀，加 5 μl 10% 的 SDS 和 5 μl 0.5 mol/L EDTA，65℃ 保温 5 min。

7）加 2 μl 蛋白酶 K，并于 37℃ 保温 30 min。

8）用等体积的酚/氯仿抽提两次，再用氯仿抽提一次。

9）用 0.1 倍体积的醋酸钠和 2 倍体积的无水乙醇沉淀。

10）每皿溶菌产物的沉淀物于 50 μl TE 中重新悬浮，如有必要，可加热至 50℃ 以使其溶解。取 2 μl 与适当的相对分子质量标准一起在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳以检测得率。

11）在 100 μl 总体积中用 5 μl RNase 和 50～100 U 的酶消化每一份 10 μl 的小量制备的 DNA 样品 2～3 h。加入 0.1 体积的醋酸钠和 2 倍体积的无水乙醇，置于冰上 5 min，于台式离心机上离心 15 min。移去上清液，空气干燥后溶于 18 μl TE 中。加 2 μl 10×凝胶加样缓冲液，电泳前加热至 68℃ 保持 3 min，然后置于冰上冷却（见注释 15）。

4. 注　　释

（1）也可使用其他的杂交膜，但我们推荐用硝酸纤维素膜，许多含尼龙的膜是很黏的，

以至它们易损坏噬菌体平皿且有高的背景。

(2) 有些人用干膜去制作影印膜。或者把膜在去离子水中预先浸湿以改善它的柔韧性，但必须将膜夹在两张 3 MM 滤纸之间除去过多的水分。至关重要的是必须确保膜湿得均匀，如果不能做到的话，可调换不同厂家的膜，或者在 0.1% SDS 中洗膜 1～2 min，接着用蒸馏水洗 5 次以充分洗净。

(3) 从甘油保藏的原种中取适当菌株在 L-肉汤琼脂平皿上划线接种，于 37℃ 倒置培养过夜。例如可用于 λEMBL 的 NM359，可用于 λgt10 的 C600，可用于 λgt11 的 Y1090，可用于 λZAP 的 Xl-1 blue。如果用 Y1090，平皿上应加氨苄青霉素 (50 μg/ml)以维持质粒 pMC9 上的 *Lac* 阻遏物。

将新长出的细菌接种到 100 ml 含有 10 mmol/L $MgSO_4$ 和 0.2% 麦芽糖的 L-肉汤培养基中，置摇床上 37℃ 培养，生长至 0.5 A_{600}时分装培养物到两个 50 ml 聚丙烯管中，于台式离心机上以 2000 *g* 离心 10 min 以沉淀细菌，小心地移去上清液，重新悬浮于 40 ml 10 mmol/L $MgSO_4$ 中。注意：沉淀可能较松散。在准备使用平皿培养出细菌前可于 4℃ 短期保存。

(4) 重要的是能使最终的放射自显影胶片上的位置与平皿上的位置相对应。由于平皿一般是正方形的或圆形的，所以定位孔的位置分布越不对称越好。

(5) 应注意不要在揭膜时连同上层琼脂一起揭下，在加上层琼脂培养物前先使平皿干燥有助于上层琼脂的附着，用琼脂糖代替琼脂同样有利。如果有上层琼脂粘到膜上必须非常小心地洗去。

(6) 杂交常产生斑点状的背景，可能被错认为是阳性的杂交噬菌斑。因而，对副本影印膜进行杂交是很重要的，这样可以减少假阳性噬菌斑数。

(7) 当将膜放到平皿上时常常会导致在平皿上向着加膜的方向轻微移动，这一现象可以加以利用，过度的移动应该避免，但是少量的移动是有用的，因为它可以导致阳性噬菌斑形成一个小的“彗”尾，可帮助从背景中识别真正的阳性。杂交过程中膜可能会轻微地伸展，因而当膜与噬菌斑对齐时应允许少量偏移。放射自显影片上的信号与单个的噬菌斑一一对齐是不可能的，因而与信号对应范围中的所有噬菌斑都应连同琼脂一起挑取，然后再进行平皿培养以作第二次筛选。通常须要再一次（第三次）筛选以确切地分离出阳性克隆。

(8) 同样的方法可用于筛选质粒文库和黏粒文库，甚至在亚克隆时还可筛选细菌转化子。不管怎样，细菌在变性前在 SDS 中溶菌（3.1 小节，第 5 步）以限制质粒 DNA 的扩散。这主要是通过从平皿的表面制作影印膜，并把菌落面朝上置于浸在 10% SDS 的 3 MM 纸上 3 min 而实现的。已制作影印膜的平皿应置于 37℃ 中几个小时使菌落在制作副本影印膜或保存平皿前能再度生长。

(9) 筛选重组子 M13 噬菌体是非常简单的，因为 DNA 是以单链形式被包装的。进行筛选时像噬菌体中描述的一样制作影印膜，然后立即在 80℃ 中烘干。

(10) 42℃ 中生长阻止溶原化的发生。

(11) 如果阳性噬菌斑很分散，那么便易于识别。重要的是噬菌斑不能相互粘连在一起，为避免这一情况的发生，平皿培养密度不能大于每平方厘米 500 噬菌斑，并且必须经常观察噬菌斑的生长。噬菌斑在 42℃ 时生长较快。

(12) 如果只须制作一张影印膜，膜可留在平皿上过夜，如要制作副本，则第一张膜放在平皿上 4 h，第二张膜 4～6 h。

(13) 如果一级抗体易于形成高的背景信号，可尝试在移去初级抗体后进行下列洗涤：用 TBST 洗一次，15 min，再用 2 mol/L 尿素，10 mmol/L 甘氨酸，1% NP40 洗一次，15 min，最后用 TBST 洗两次，每次 15 min。

(14) 用上层（0.7%）和底层（1.4%）琼脂糖替代琼脂，这样可以避免存在于琼脂中的限制性内切酶抑制物。

(15) 被克隆的 cDNA 插入片段通常仅是 λ 噬菌体 DNA 的一小部分。因此须要酶切大量的噬菌体总 DNA，以便凝胶电泳后能观察到插入片段。记住，这将比通常的限制性内切酶的酶切需要更多的酶。基因组克隆中包含较大量的插入片段，因此只须分析较少量的 DNA。

参 考 文 献

1. Hyunh, T. V., Young, R. A., and Davis, R. W. (1985) Constructing and screening cDNA libraries in Lambda gt10 and Lambda gt11, in *DNA Cloning I, A Practical Approach* (Glover, D. M., ed.), IRL, Oxford, UK.
2. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual,* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
3. Cowell, I. G. and Hurst, H. C. (1994) in *Protocols for Gene Analysis. Methods in Molecular Biology,* vol. 31 (Harwood, A. J., ed.), Humana, Totowa, NJ, pp. 363–376.
4. Mutzel, R. (1994) in *Protocols for Gene Analysis. Methods in Molecular Biology,* vol. 31 (Harwood, A. J., ed.), Humana, Totowa, NJ, pp. 397–408.
5. Guesdo, J. I., Ternynck, T., and Avrameas, S. (1979) The use of avidin-biotin interaction for immunoenzymatic techniques. *J. Histochem. Cytochem.* **27,** 1131–1139.
6. Buckland, R. M. (1986) Strong signals from strepavidin-biotin. *Nature* **320,** 557,558.
7. McGookin, R. (1988) *New Nucleic Acid Techniques. Methods in Molecular Biology*, vol. 4 (Walker, J. M., ed.), Humana, Clifton, NJ, pp. 301–306.
8. Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

第四部分
亚克隆方法

第二十七章　亚克隆的策略与方法

Danielle Gioioso Taghian，Jac A. Nickoloff

1. 引　　言

亚克隆技术用于将DNA片段从一个载体（质粒、黏粒或噬菌体）转移到另一个载体上。它们通常用于构建表达系统，或是将DNA片段转移到特殊的载体上以制备杂交探针或是制备测序用的单链模板。典型的载体含有三个必要的元件：一个抗生素抗性标记、一个复制起点（以便选择转化了的大肠杆菌宿主）以及一个或多个可供插入外源DNA片段的限制酶切位点。噬菌体载体，例如建立在M13[1]基础上的载体是不用抗性标记的，因为转化子所产生的病毒颗粒可将被感染的细菌杀死或使它长得很慢，这样就在未感染的菌苔上出现了噬菌斑。下面我们介绍各种通用的亚克隆策略与方法，一些更加专门的策略将在其他章节中讨论（例如参考文献2）。

基本的亚克隆操作包含四步：首先用合适的限制性内切酶切割载体与插入片段，接着用T4 DNA连接酶将DNA片段与载体连接，然后转化宿主大肠杆菌，最后筛选出含有所需结构的重组质粒。限制酶切割所产生的末端可以是3′突出、5′突出或是平末端。尽管任何一个平末端都能连接，但是突出的末端更易于黏合。所以载体与插入片段经常用同一种酶切割，连接后形成与原来相同的切点。虽然两种酶可能识别不同的酶切位点，却能产生可以黏合的3′或5′端。在这种连接中，原来的酶切位点不再出现。平末端的连接可以为亚克隆方案提供比较宽松的设计，但是连接效率低；至于黏性末端则只有通过用同一种酶切割所产生的两个末端相连时，方能形成原来的位点。较新的载体的特点是具有一连串独特的限制酶切点（多位点接头），从而提供了多种不同的黏性末端与平末端而有利于亚克隆的进行。很多限制酶切割的DNA片段可以插入到多聚接头中去，旁边的位点也可能在以后的操作中利用。

亚克隆仅仅包含两段线型DNA分子的连接，通常形成环状的重组分子。当载体与插入片段具有同样黏性末端时，插入片段以相等的比例形成插入方向相反的两种重组分子，如图27.1（A）。如果用产生不相同末端的两种限制酶对载体和插入片段分别作双酶切时，插入片段就只能以一个方向与载体进行连接，如图27.1（B）。这种定向克隆也包括一个末端是平末端而另一个末端是5′或3′突出的。在许多亚克隆操作中所希望的重组子往往只以很低的频率出现，这是因为双分子反应速率远远低于载体重新环化以及形成其他不希望有的产物的单分子反应速率。通过优化DNA浓度可以促进所希望的双分子产物生成[3]，但是在我们的经验中，这种调节是不必要的。我们通常使用的载体与插入片段的分子比在1:1到1:2之间，这一比例的增加会减少不需要的亲本载体，但总的效率并没有增加，因为插入多个片段的产物增加了。即使在最适条件下连接的分子中也只有一小部分是所希望的产物。在本章中我们将介绍能提高亚克隆效率的、可以

单独或组合使用的各种策略，这些策略包括有利于鉴定出稀有产物的筛选步骤以及富集所需产物的选择步骤。

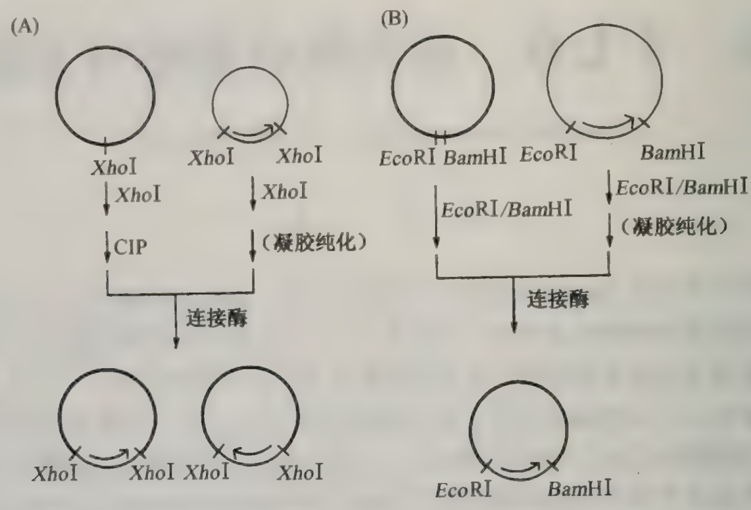


图 27.1 (A) 相同黏性末端片段的连接。*Xho*I 酶将受体（粗线）线性化并将一个片段从供体（细线）上切割下来。将受体作去磷酸化处理并将片段纯化可以减少不需要的产物。片段可以以两个方向插入。本图以及随后的图中列于括号中的是供选用的步骤，这些步骤可能增加所需产物的产量。(B) 片段的定向连接。*Eco*R I 与 *Bam*HI 酶切后的末端序列不配对，防止了每一个组分的自连。胶纯化步骤保证了只回收所需的连接产物。片段的插入只能以一个方向进行。

筛选步骤中包括物理的与表型的两种筛选方法。最直接的物理筛选方法是抽提10～20个转化子的少量培养物中的质粒 DNA，然后制作物理图谱。如果所期望产物以10%或更高的频率出现时，推荐使用这个快速而有效的方法，例如亚克隆操作中包括富集所需产物的各个步骤。其他一些物理的筛选方法虽然能够鉴定出以很低频率出现的可能的亚克隆，但以后的工作更加费时间，因为仍须要制备质粒 DNA 并通过制作限制酶图谱方能确切地鉴定其是否就是所需要的克隆。例如可以从 6～10 个转化子的混合培养物中抽提质粒进行图谱分析，用这个方法可以筛选 200 个甚至更多的转化子。从某一组混合转化子的抽提物中鉴定到所需质粒，接着可以从母平皿上成片的转化子中回收这一质粒。检出频率低至 10^{-2}的所需质粒的一个快速方法中包括电泳分析裂解的菌落中的未经纯化的超螺旋 DNA（“lid 溶菌产物”)[4]。用裂解菌落法筛选往往只有当插入片段使亲本载体的相对分子质量增加 25%或更多时方才有效。建立在 PCR 基础上的一些方法的检测水平也大致相似，但是价格偏高。也可以用亚克隆中同样的 DNA 片段制备的探针进行菌落杂交筛选，这种方法的灵敏度极高，可以检测非常稀有的产物($<10^{-6}$)。但是由于杂交筛选很费时间，所以很少用于常规的亚克隆筛选上。

表型筛选的方法非常有效并且易于进行，当载体的克隆位点或是多聚接头位点存在于第二个表型标记内部时即可进行表型筛选，片段插入到这些位点后通常会使标记失活。第二个标记可以是抗生素的抗性基因，例如在 pBR322 中的抗性基因[5]。在这种情况下携带重组质粒的转化子印影到含有第二种抗生素的平皿上便不能生长，但可以从母

平皿上回收得到。在一种基于标记失活的一步筛选中利用了大肠杆菌的 *lac*Z 基因中的一部分序列，例如 pUC119[1]。这些载体转化到带有第二个 *lac*Z 基因缺陷的特定菌株中（例如 DH5α 或 JM101），*lac*Z 基因可以被异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG）所诱导。两种 *lac*Z 基因产物通过互补而形成一个有活性的半乳糖苷酶，分解生色底物 X-GAL 后形成蓝色菌落。DNA 片段插入 *lac*Z 使基因失活，形成白色菌落。尽管插入失活的方法有效而又方便，但却不能用于再次插入片段的筛选。

选择策略比筛选策略更加有效。有几种选择步骤是建立在环状 DNA 分子比线性 DNA 分子的转化效率高 10～1000 倍[6,7]的基础上的，这一方法决定于能否防止不需要的产物环化或需要的1）产物线性化。一个非常有效并且通用的方法包括 DNA 片段与载体相连接前用小牛肠碱性磷酸酯酶（CIP）对线性载体进行去磷酸化处理，如图 27.1（A）。T4 DNA 连接酶催化 DNA 末端的 3′羟基与 5′磷之间形成新的磷酸二酯键。正常的情况下每一个连接的末端产生两个新的键，也即当一个片段插入到载体中去时产生四个新的键。去磷酸化可以防止载体 DNA 的自连，这是由于 T4 DNA 连接酶只能在 5′磷末端上发生反应。但是去磷酸化的载体可以与插入片段的 5′磷末端连接生成带有两个新键、而在相对链上具有两个单链切口的环化分子。不需要的产物也可能由载体携带其他片段所形成。为了避免这类情况的发生，可先用限制性内切酶从质粒上切下所需要的片段，电泳分离后切割凝胶，将片段纯化后再与（CIP 处理过的）载体连接，如图 27.1（A）。对于定向克隆的策略来说，CIP 处理载体就没有必要了，因为载体有两个不配对的末端而不能自环。当定向克隆中包含有两个很近的连接位点时，例如在多位点接头（polylinker）上，通常不须要用凝胶纯化的方法将载体大片段从多位点接头小片段中分离出来，相反地可以通过琼脂糖凝胶 CL-6B 离心柱将小片段除去。

一种更加特殊的策略是包括用两种不同的限制性内切酶切割载体与插入 DNA，所产生的非黏性末端为带有 4 个碱基的 5′突出末端。每个突出末端用 T4 DNA 聚合酶将四个碱基中的两个补平（图 27.2），这样形成的两个碱基的突出末端就不会发生自连，但载体和插入片段却可以相互连接[8]。

另一个简单而有效的方案是使用识别不同位点然而却能产生黏性末端的酶，在图 27.3（A）中载体用 *Xho* I 切割，待克隆片段由 *Sal* I 切割产生。*Sal* I 片段能有效地与经切割的 *Sal* I 或 *Xho* I 位点相连，当与载体片段连接时会生成与以上两者都不相同的位点。连接后用其中的一种酶（或二种都用）处理，切开可能形成的亲本载体。这些线状的分子转化细菌时效率非常低。所需的产物由于不能被酶消化而保持环状，所以具有较高的转化效率。表 27.1 中所列为能产生匹配末端的几组酶。这个方案对于用不同酶切而产生的平末端进行亚克隆也非常有效。这个方案的一个优点是不须用 CIP 处理。除了在克隆过程中使用的酶切位点外，其他的限制酶切位点还可用于通过选择去除不需要的产物。任何位点只要存在于不需要的产物之中，而所需产物中无此位点时就可用于在连接反应中使不需要的产物线性化，如图 27.3（B）。这个方案常可用于定向克隆，因为两个多位点接头片段间其他克隆位点已被消除。

1）原文误作不需要的。——译者注

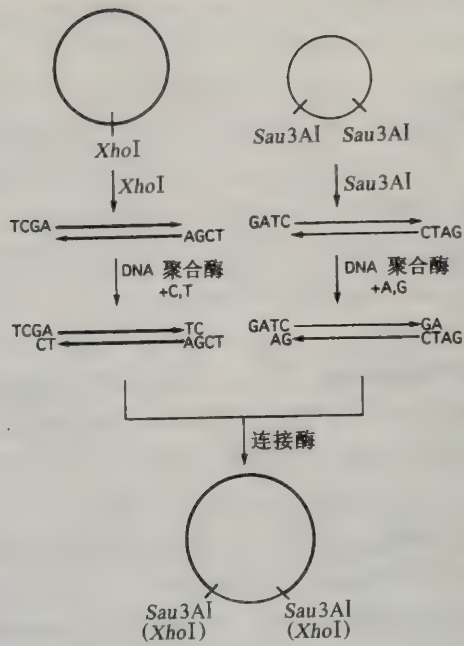


图27.2　带有部分补平末端的片段的连接。*Xho* Ⅰ与 *Sau*3AⅠ酶切后产生不配对的4个碱基突出的5′端，经部分补平后就可以进行载体与供体的连接，但不会发生自连。*Xho* Ⅰ位点不会重新出现。

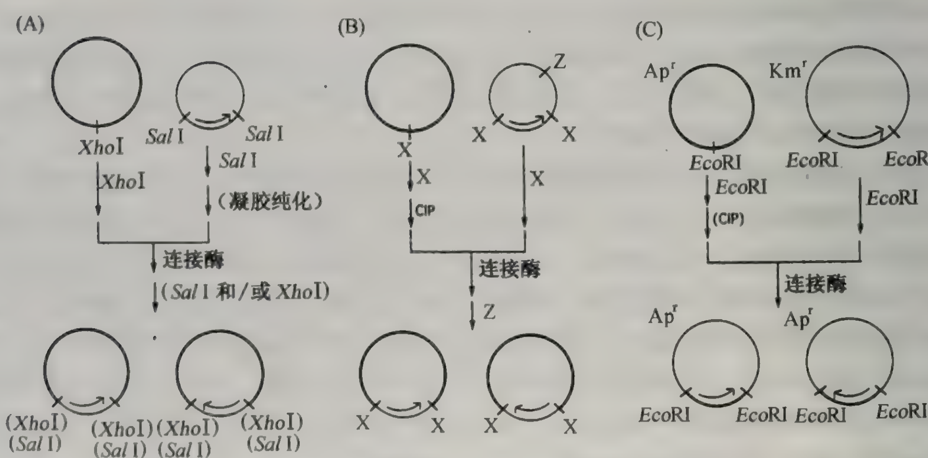


图 27.3　三种有效的亚克隆方案。(A) 用 *Sal* Ⅰ与 *Xho* Ⅰ酶切后产生不同的黏性末端，连接后产生两种酶都不能切割的位点。连接反应后可以用两种酶中的任何一种或是用两种酶将重新环化的亲本质粒在原来的酶切位点上切成线性分子。(B) 用识别位点为 Z 的酶切割连接混合物，将不需要的产物线性化，但所需的产物中必须没有 Z 位点。(C) 从 Km^r 质粒上切下的片段连接到 Ap^r载体上去。产物可通过独特的 Ap^r、Km^s表型来筛选。

表 27.1　产生黏性末端的成组的酶[a]

组号	酶
1	*Eco*R Ⅰ，*Mun* Ⅰ
2	*Nco* Ⅰ，*Bsp*H Ⅰ（*Afl* Ⅲ）[b]
3	*Age* Ⅰ，*Xma* Ⅰ，*Ngo*M Ⅰ，*Bsp*E Ⅰ
4	*Bss*H Ⅱ，*Mlu* Ⅰ（*Dsa* Ⅰ）
5	*Spe* Ⅰ，*Xba* Ⅰ，*Avr* Ⅱ，*Nhe* Ⅰ
6	*Bgl* Ⅱ，*Bam*H Ⅰ，*Bcl* Ⅰ
7	*Eag* Ⅰ，*Bsp*120 Ⅰ
8	*Bsi*W Ⅰ，*Acc*65 Ⅰ，*Bsr*G Ⅰ
9	*Sal* Ⅰ，*Xho* Ⅰ
10	*Ppu*10 Ⅰ，*Apa*L（*Sfc* Ⅰ）
11	*Pst* Ⅰ，*Nsi* Ⅰ（*Bsp*128 Ⅰ）
12	*Psp*1406 Ⅰ（*Bsa*H Ⅰ）
13	*Cla* Ⅰ，*Bst*B Ⅰ

a 经任何一组的两种酶切割后所形成的黏性末端连接时不恢复原有的两个酶切位点。

b 括号中的酶识别不止一种酶切位点，某些或全部识别位点的切割产生特定的黏性末端。

如果供体与载体具有遗传上的或是结构上的特殊性质，就能据此设计高效而又非常简单的亚克隆方案。如果一个特定的片段须要反复地进行亚克隆，那么这样的设计就特别有价值。这一设计要使用两个具有不同抗性标记的亲本质粒。图 27.3（C）展示了一个片段从卡那霉素抗性（Km^r）质粒上转移到氨苄青霉素抗性（Ap^r）的载体上去的设计方案。所需的产物可以在含有氨苄青霉素的平皿上进行选择。用 CIP 处理氨苄青霉素抗性的载体可以降低得到亲本（Ap^r）载体的机会，而重行环化的供体质粒则因为对氨苄青霉素敏感而不会出现在平皿上。因此这个方案无须从胶中纯化所需片段这一操作步骤。就像以上讨论的那样，定向克隆可以不用 CIP 处理。Nickoloff 和 Reynolds[9]将 Km^r-Ap^r方案与不同酶切的黏性末端连接方案联合使用而省略 CIP 处理或胶纯化步骤，所需产物的得率可达 90%以上。

由于限制酶切点对于高效的亚克隆方案起着重要的作用，所以经常须要在特定的部位消除或引入一个新的位点，下面介绍两种实现这一修改的方法。酶的切点可以通过 T4 DNA 聚合酶对 5′或 3′突出末端补平形成平末端后自连而消除（图 27.4）。这些反应往往使消除酶切位点之处引入 2～4 个新的碱基对。如果这一缺失恰在编码顺序内时可以造成基因失活。因为绝大多数酶的识别位点是回文对称的，填平 5′端的自连可能形成被其他限制酶识别的新的回文对称序列[10]。另一个产生新位点的方法是通过接头的插入（图 27.4）。接头是具有回文对称序列的平末端 DNA 序列（8～10 bp），与平末端连接后可以产生新的酶切位点。接头与平末端的连接非常有效，因为在连接反应中可以使用过量的摩尔浓度。接头的插入通常会破坏插入位点，但是可以通过设计重新产生原来的位点。在这种情况下接头的两侧将会出现两个原有的酶切位点。接头也可以在片段插入载体之前预先加 在片段的两个末端。更加有效的操作方法是利用接头克隆具有平

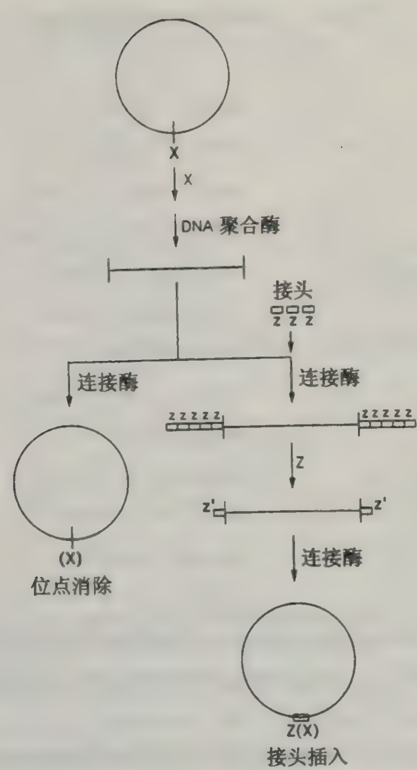


图 27.4 位点的消除与接头的插入。用 T4 DNA 聚合酶填补的平末端再连接后可以消除 X 点（左侧）或是通过连接产生新的位点（右侧）。连接有时会重新形成目标位点 X。

末端的 DNA 片段，而不是直接将具有平末端的片段插入到平末端的切点中去。

亚克隆操作包括很多连续的酶切步骤，在进行下一步操作时通常应将上一步使用的酶灭活或去除。从前纯化时先用酚/氯仿抽提，然后再用乙醇沉淀[2]。这是一个耗费时间（30～60 min）的方法，若代之以 Sepharose CL－6B 离心柱层析则操作只需 5 min，所以多步骤的操作可以方便地在一天之内完成。这种柱能去除小分子物质（例如盐、SDS、核苷酸以及小于 100 bp 的 DNA 片段）并能使大多数的酶去除或失活。DNA 回收在 TE（10 mmol/L Tris-1 mmol/L EDTA）中，回收的 DNA 的浓度可以达到 DNA 加入时的浓度[11]。

2. 材　　料

2.1 DNA 的酶切

1）质粒 DNA：一般用已纯化的 DNA 作为亚克隆的起点，但其实甚至是微量抽提的粗制品也是可以用的（参见第十三至三十三章）。

2）限制酶与缓冲液：可从各个制造厂家购得，一般都随同供应缓冲液。

3）TE：10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，1 mmol/L EDTA，高压灭菌。

2.2 Sepharose 离心柱层析

1）1.5 ml 微型离心管（有盖或无盖的）。

2）27 号针头。

3）硅化玻璃珠：200～300 μm（直径）（Sigma，St. Louis，MO）。用氯仿洗涤玻璃珠除去机油，然后浸在含 5 %二甲基二氯硅烷的氯仿和 95%乙醇中 5 min。用 95%乙醇与蒸馏水交替洗涤 5 次，最后放在蒸馏水中高压灭菌。处理过的玻璃珠很容易用吸管吸起来，并且由于他们的疏水特性，可以防止 DNA 因粘附于上而造成损失。

4）Sepharose CL-6B：（Pharmacia，Piscawaty，NJ）。用等体积的 TE 洗涤 8 次，然后以 60% CL-6B 与 40% TE 的比例悬浮成糊状物。以 100 ml 为单位分批高压灭菌 40 min，小心地保持无菌状态，因为处理过程中已将防腐剂除去。贮存于 4℃ 中 CL－6B至少可以稳定一年。

5）10×终止混合液：50% 甘油，0.5% SDS，10 mmol/L EDTA，0.25% 溴酚蓝，0.25%二甲苯青（同样用作琼脂糖凝胶点样缓冲液）。

2.3 质粒去磷酸化

1）10×CIP 缓冲液：500 mmol/L NaCl，100 mmol/L Tris-HCl、pH 7.9，100 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L DTT。

2）CIP：贮存于 4℃。

3）酚/氯仿/异戊醇（25∶24∶1）：用 pH 8.0 的 TE 平衡酚。

2.4 5′端的填人与 3′端的去除

1）10×T4 DNA 聚合酶缓冲液：500 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L DTT，500 μg/ml 乙酰化 BSA。

2）2 mmol/L dNTPs（从 10 mmol/L 的贮存液中新鲜配制）。

3）T4 DNA 聚合酶：3 U/μl，贮存于－20℃。

2.5 接头的磷酸化与连接

1）接头：以每毫升 10 A_{260}的浓度溶于蒸馏水中（参见注释 1）。

2）10×激酶缓冲液：700 mmol/L Tris-HCl、pH 7.6，100 mmol/L $MgCl_2$，50 mmol/L DTT。

3）1.0 mmol/L ATP：从 20 mmol/L 的贮存液中新鲜配制。

4）T4 多核苷酸激酶：10 U/μl，贮存于－20℃。

5）10×连接缓冲液：500 mmol/L Tris-HCl、pH 7.8，100 mmol/L $MgCl_2$，100 mmol/L DTT，10 mmol/L ATP，250 μg/ml BSA。

6）T4 DNA 连接酶：400 U/μl（参见注释 2）。New England Biolabs（Beverly，MA）的产品较好，贮存于 -20℃。

2.6　在 X-GAL 平皿上筛选重组 DNA

1）X-GAL：20 mg /ml X-GAL，溶于二甲基甲酰胺，-20℃贮存。

2）IPTG：100 mmol/L IPTG，溶于蒸馏水，-20℃贮存。

3. 方　　法

3.1　DNA 的酶切

所有亚克隆操作的第一步都是选用合适的酶切割参与克隆的 DNA。在 20 μl 的反应体积中切割每种 DNA 1～2 μg（参见注释 3）。每个样品取出 1/10 进行琼脂糖凝胶电泳分析以检查酶切是否完全（参见注释 4）。用 Sepharose CL-6B 柱离心纯化剩余的 DNA（详见 3.2 节）。

3.2　Sepharose 离心柱层析

在亚克隆过程中的每一步酶切反应后都应用 Sepharose CL-6B 柱纯化 DNA。

1）用 27 号针头在管子的底部刺一个孔，用滴管吸入约 50 μl 的玻璃珠。

2）剧烈振荡 Sepharose CL-6B 使之彻底悬浮，在柱上加入约 10 倍于待纯化 DNA 体积的 CL-6B。将柱轻放在第二个管子上，如果形成密封，可能由于压力而使流速变慢。

3）在甩平转头上以 600 *g* 离心 2 min，弃去下层套管，将柱转移到新的管子上。

4）柱准备过程中加入 1/10 倍 DNA 体积的 10×终止混合物，置于涡旋振荡器上稍加振荡，65℃加热 3 min。

5）将 DNA 样品均匀地放在预先离心好的柱上（在柱制备后 30 min 内），以 600 *g* 离心 2 min，含 DNA 的溶液收集在下面这一管子中（参见注释 5 与 6）。

3.3　质粒 DNA 的去磷酸化处理

1）加入 2.5 μl 的 10×CIP 缓冲液和大约 1 μg 线性化的载体至 1.5 ml 的离心管中，再加蒸馏水至终体积为 25 μl。

2）加 0.1～1.0 U 的 CIP，混匀后 37℃保温 1 h。

3）加 dH_2O 至 50 μl，用等体积的酚/氯仿/异戊醇抽提并终止酶反应。吸出水相。用 Sepharose CL-6B 柱进行纯化（参见注释 7）。

4）为了评估反应的效率，将去磷酸化的载体分成二个均等的部分，一部分用于与亚克

隆片段连接（见 3.6 节），另一部分用于自连反应。两个反应的体积应相同。连接反应后用 CL－6B 柱纯化，从两个反应中取出相同的量转化大肠杆菌，这样可以了解在预期的克隆中自连产物所占的比例。

3.4　5′端的补平和 3′端的切平

这一操作用于制备各种亚克隆方案中所必需的 DNA 平末端（参见注释 8）。

1）1.5 ml 的离心管中加入 1.5 μl 2.0 mmol/L 的 dNTPs、2.5 μl 的 10×T4 聚合酶缓冲液以及大约 1.0 μg 线性化的质粒 DNA（见第 3.1 节），加蒸馏水至终体积为 25 μl。

2）加入 2.4 U 的 T4 DNA 聚合酶，混合后 37℃ 保温 20 min 以补平 5′突出端，并保温 5 min以去除 3′突出端（参见注释 9）。

3）通过 Sepharose CL-6B 柱纯化 DNA。

3.5　接头的磷酸化与连接

1）1.5 ml 的离心管中加入 1 μl 10×激酶缓冲液、1 μl 1.0 mmol/L ATP、2 μl 接头，然后加 dH_2O 至 10 μl。

2）加入 10 U T4 多核苷酸激酶，37℃ 保温 2 h。在与 DNA 连接之前不必纯化磷酸化的连接物（参见注释 10 与 11）。

3）平末端 DNA 中加入 5 μl 磷酸化的接头与 3.5 μl 10×连接缓冲液（见第 3.4 节）并加 dH_2O 至 35 μl。

4）加入 400 U 的 T4 DNA 连接酶，混匀后 16℃ 保温 30 min。

5）通过 Sepharose CL－6B 柱纯化 DNA。

6）用 50～100 U 的限制酶消化 DNA 至少 4 h 以去除过量的接头（参见注释 11）。通过 Sepharose CL－6B 柱纯化。

7）与质粒载体的连接：混合 4 μl 10×连接缓冲液、35 μl 第 6 步的反应物以及 400 U 的 T4 DNA 连接酶，16℃ 保温 2 h。通过 Sepharose CL－6B 柱纯化后转化大肠杆菌。

3.6　片段与载体的连接

1）如有必要可以通过凝胶纯化所须转移的 DNA 片段（参见第二十八章），并将受体 DNA 去磷酸化（见第 3.3 节）。

2）取 1.5 ml 离心管，加入载体与插入 DNA，二者的物质的量的比例范围从 1∶1 至 1∶2（各约1 μg），以及 3 μl 10×连接缓冲液，加 dH_2O 至 30 μl 。

3）加入 400 U T4 DNA 连接酶，混匀后 16℃ 保温。连接黏性末端时保温 2 h，连接平末端则须保温 4 h 以上（参见注释 12 与 13）。

4）通过 CL-6B 柱纯化 DNA，用于转化大肠杆菌（参见第二十九与三十章）。

3.7 用X-GAL平皿筛选重组子

如有片段插入到质粒的 *lac*Z 基因内，转化子呈白色，亲本载体的 *lac*Z 基因是完整的，所以转化子呈蓝色。

1) 将 X-GAL 与 IPTG 各 40 μl 涂布在含有合适抗生素的 LB 平皿上，待干。
2) 涂布转化菌，37℃培养过夜。
3) 平皿可以放在 4℃中冷冻几小时使颜色更加明显。

4. 注　　释

(1) 已经去磷酸化的和未经去磷酸化的接头都能购买到。为了保证能获得最高的效率我们推荐在临用前对接头进行磷酸化。

(2) 连接酶单位的定义至少有两种，这里使用的酶单位是 New England BioLabs 公司的定义。如果是从其他公司购买的酶应根据他们的说明使用。

(3) 将反应物恰当地混合似乎是很平常的，但是对于所有的酶反应来说却是非常重要的。酶总是最后一个加入到反应体系中的成分，加入后必须缓慢地吸放液体或是拍击管子使其中的组分彻底混匀，使用涡旋振荡器可能使酶失活。反应完成后加入终止混合液，用振荡器剧烈振荡并加热至 65℃使酶失活，最后用 CL－6B 柱进行纯化。

(4) 在亚克隆实验中开始时质粒 DNA 的消化是非常关键的一步，因为以后所有的亚克隆步骤中都要依赖这一反应所产生的末端。酶反应后总是要取出总体积的 1/10 进行琼脂糖凝胶电泳以检查酶切的完全程度。未被酶切的载体的转化效率很高，造成不能接受的亲本质粒的高本底。

(5) 蓝色的指示染料作为离心柱的内部对照。若在洗脱液中出现染料，说明柱同样不能滞留其他小分子。用稍多一些的 Sepharose CL－6B 将样品再度上柱。当使用多根柱处理 DNA 时染料也能起到识别哪一根柱已经上过 DNA 样品的作用。

(6) 回收的 DNA 片段小于 100 bp 时，例如回收接头、引物与 PCR 扩增的小片段时不用 Sepharose CL-6B 柱，因为它们会滞留在柱中。

(7) CIP 必须通过酚抽提以去除干净，否则会在以后的连接过程中使插入片段发生去磷酸化作用。所有其他的 DNA 修饰酶，也包括热稳定的酶，都可以通过 Sepharose CL－6B 纯化而被灭活或去除。

(8) 尽管大肠杆菌的 DNA 聚合酶的 Klenow 片段与 T4 DNA 聚合酶都能使 3′或 5′突出端形成平末端，但是 T4 DNA 聚合酶具有更强的 3′→5′外切活力，所以是去除 3′端突出部分的首选酶。我们使用 T4 DNA 聚合酶使 5′与 3′突出端都变为平末端。

(9) 如果核苷酸浓度太低，T4 DNA 聚合酶的 3′→5′外切活力会很快降解掉一大段 DNA。该酶在平末端反复地加上和除去末端的核苷酸，这一循环使核苷酸库的浓度迅速降低，所以这些反应不能超过规定的时间并且不能使用过量的酶。

(10) 如果需要，可用自连反应来评估接头的磷酸化效果，连接后的产物在 5%～10%的

丙烯酰胺胶上电泳观察结果。磷酸化的接头可以相互连接并且形成具有特征性的阶梯状条带。在旁边的孔中点上未用连接酶处理的样品作为对照。

(11) 接头的连接反应应短于 30 min，因为连接时间过长会产生由更多的接头相连的产物，它们必须在下一步中去除。如果要消化接头连接反应系统中过量的接头，则应尽量多用一些限制酶（通常可以用到反应总体积的 10%）。这是必需的，因为底物中有着大量的目标位点。

(12) 具有一个平末端与一个黏性末端的片段之间的双分子连接反应效率明显高于两个平末端的连接反应效率。单分子（环化）反应对平末端或黏性末端都比较有效。我们不用电泳的方法检测连接反应的结果，因为这些反应往往不能形成独立的条带。

(13) 连接反应中 DNA 的浓度调节在小于或等于 50 μg/μl，这样可有利于生成环化产物而不是生成多连体产物。

参 考 文 献

1. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33,** 103–119.
2. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
3. Dugaiczyk, A., Boyer, H. W., and Goodman, H. M. (1975) Ligation of *Eco*RI endonuclease-generated DNA fragments into linear and circular structures. *J. Mol. Biol.* **96,** 171–184.
4. Hoekstra, M. F. (1988) Lid lysates: an economical and rapid method for plasmid analysis. *Biotechniques* **6,** 929–932.
5. Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Heynecker, H. L., Boyer, H. W., Crosa, J. H., and Falkow, S. (1977) Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2,** 95–113.
6. Cohen, S. N., Chang, A. C. Y., and Hsu, L. (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of Escherichia coli by R-factor DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69,** 2110–2114.
7. Conley, E. C. and Saunders, J. R. (1984) Recombination-dependent recircularization of linearized pBR322 plasmid DNA following transformation of *Escherichia coli. Mol. Gen. Genet.* **194,** 211–218.
8. Hung, M.-C. and Wensink, P. C. (1984) Different restriction enzyme-generated sticky DNA ends can be joined in vitro. *Nucleic Acids Res.* **12,** 1863–1874.
9. Nickoloff, J. A. and Reynolds, R. J. (1991) Subcloning with new ampicillin and kanamycin resistant analogs of pUC19. *Biotechniques* **10,** 469–472.
10. Nickoloff, J. A. (1992) Converting restriction sites by filling in 5' extensions. *Biotechniques* **12,** 512–514.
11. Nickoloff, J. A. (1994) Sepharose spin-column chromatography: a fast, nontoxic replacement for phenol:chloroform extraction/ethanol precipitation. *Mol. Biotechnol.* **1,** 105–108.

第二十八章　应用玻璃珠从琼脂糖凝胶中纯化 DNA 片段

Etienne Joly

1. 引　　言

在进行连接反应前或是标记探针前通常要选择一定大小的 DNA 片段。琼脂糖凝胶电泳后纯化 DNA 片段的方法有很多种，包括用低熔点琼脂糖法、DEAE 纸片法、电洗脱法（有多种）以及使用各种 DNA 结合材料的方法。以下的方法建立在碘化钠能够溶解琼脂糖凝胶以及在高盐浓度中 DNA 能够结合到玻璃表面的基础上。研成粉末状的玻璃与 DNA 结合能力非常强。洗涤后玻璃上结合的 DNA 极易被洗脱到水中，终浓度可达 100 μg/ ml。

以下介绍的方法最初是由 Vogelstein 与 Gillespie 报道的[1]。这一方法快速、可靠、价格便宜并且回收率高达 90%。回收的 DNA 可用于限制酶切割、连接反应以及标记反应。有些实验室甚至用这种方法纯化 DNA，用于对受精的卵母细胞进行微注射以制作转基因鼠。这个方法也可用于高相对分子质量 DNA 的纯化而无明显的降解。但是在片段小于 400 bp 时效率有所下降，尤其当片段非常短（<200 bp）时回收效率急剧下降。此法惟一的缺点是必须在 TAE 缓冲液配制的琼脂糖凝胶上分离 DNA。

2. 材　　料

2.1　制备玻璃珠糊

1）硅粉，325 目：燧石玻璃可以从陶瓷制品商店购得。其中一种是美国燧石玻璃公司的产品，是从研碎的闪烁管制得。此外也可使用从 Sigma（St. Louis，MO）（S-5631）购得的硅粉，但是其中含有很高比例的极细颗粒，须用差速沉降法除去（见 3.2 节）。

2）硝酸（分析纯试剂）：在使用浓酸时必须非常小心，要戴上手套并在通风橱中打开瓶盖。

3）灭菌蒸馏水：使用双蒸水并经高压灭菌。

2.2　从琼脂糖凝胶中纯化 DNA 片段

1）50×TAE 电泳缓冲液：242 g Tris 碱，57.1 ml 冰醋酸，100 ml 0.5 mol/L EDTA、pH 8.0，加水至 1 L。

2）NaI 溶液：90.8 g NaI（Sigma S－8379），1.5 g Na_2SO_3（Sigma S－0505），加灭菌蒸馏水至终体积为 100 ml。4℃贮存于暗处或不透明的容器中（参见注释 1 与 2）。
3）乙醇洗涤液：50 % 乙醇，100 mmol/L NaCl，10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，1 mmol/L EDTA。室温贮存于密封的容器中。

3. 方　　法

3.1　从碎玻璃制备玻璃珠糊

1）将 250 ml（220～250 g）玻璃粉放在 500 ml 烧杯中，倒入 500 ml 蒸馏水搅拌 1 h。
2）静置 1 h 后将上清液倒进一离心瓶中，4000 *g* 离心 5 min。将沉淀悬浮于 200 ml 水中，转移到 Pyrex™烧杯中。
3）加入 200 ml 浓硝酸（大约 70%），在通风橱中烧至近沸。
4）冷却后转移到离心瓶中，用灭菌重蒸水悬浮、离心，共洗涤四次。
5）将沉淀悬浮在灭菌蒸馏水中制成 50%的糊状物（v/v），分成小份装在密闭的容器中贮存于 4℃，防止水分蒸发（参见注释 3）。

从 250 ml（220～250 g）的玻璃粉末中可以得到大约 25 ml 细颗粒精制物(50 ml 50%的糊状物)。使用前须再检查一下糊状物中水的比例是否约为 50%，如果水分蒸发可以加入一些灭菌的蒸馏水。

3.2　从硅粉制备玻璃珠糊

这种粉末中含有极细的颗粒，可用粗放的沉淀方法将其去除。
1）将 100 g 硅粉放在 500 ml 的烧杯中，加入 500 ml 蒸馏水搅拌 1 h。
2）沉淀 2 min 后倒入干净的烧杯中除去已经下沉的团块，放置 2 h。
3）倾滗去上清液后回收沉淀部分，这时体积大约为 50～75 ml。这步操作必须非常小心，因为下沉的部分流动性很大，容易漂浮起来，可能被一起倒掉。所以最好的方法是将上清液倒在另一烧杯中，至少是初次进行这样的操作时可以这样做。
4）加入蒸馏水至 200 ml 按照 3.1 节第三步进行操作。

从 100 g 硅粉中应该可以得到 100～150 ml 的 50%糊状物。

3.3　从琼脂糖凝胶中纯化 DNA

1）用 TAE 缓冲液在琼脂糖凝胶上分离 DNA 片段（参见注释 4）。
2）在透射紫外线灯下观察待纯化的 DNA，并将这块琼脂糖凝胶切下（参见注释 5 与 6），装在 1.5 ml 的离心管内。
3）估计琼脂糖凝胶的质量并按每毫克琼脂糖凝胶 2～3 μl NaI 溶液的比例加入 NaI。
4）保温直至琼脂糖凝胶熔化，这一过程需要 5～10 min，偶尔地摇动可以促进这一过

程。

5）加入 2～5 μl 玻璃珠糊至一小管并在旋涡振荡器上混匀（参见注释 7)。室温放置 10 min, 其间偶尔摇动或振荡。

6）在微型离心机中离心 20 s 后弃去上清液。

7）加入 500 μl 乙醇洗涤液后用微量移液器吸放数次悬浮沉淀，然后按照第 6 步离心。重复两次。

8）最后一次洗涤后再离心一次，小心地抽气吸去最后一滴乙醇，沉淀物于空气中干燥数分钟。

9）用 10～20 μl 水悬浮沉淀后于 55℃ 保温 5 min。按照第 6 步离心并收集含已纯化的 DNA 的上清液。

10）重复第 8 与第 9 步，合并两次洗脱 DNA 的上清液。

11）按照第 6 步再次离心 DNA 洗脱液，然后将 90％的上清液转移到干净的管子中，确保不将可见或不可见的玻璃粉沉淀也吸到上清液中去（参见注释 8)。

DNA 片段现在已可使用。这个操作步骤也可用来净化质粒 DNA 的制备物（参见注释 8)，例如供测序用的模板（见第 45 章)。

4. 注　　释

(1) 并非所有的亚硫酸盐都能溶解。但不用担心，因为这只是用来作为抗氧化剂的。

(2) 这一溶液会随着时间的推移而变黄，但不会显著影响它的活性。

(3) 玻璃珠糊可于 −20℃ 或 −70℃ 长期保存。

(4) 所使用的琼脂糖的纯度必须是分子生物学级，特别是当 DNA 要用于连接反应时。并且不能用低熔点胶，TBE 电泳缓冲液制的胶也不宜使用。

(5) 切割琼脂糖胶上的 DNA 片段时胶块越小越好。

(6) 这一操作进行得越快越好，因为紫外线对待纯化的 DNA 和实验人员都不利。

(7) 1 μl 的玻璃珠糊足够回收 2 μg DNA，但是为了得到好的沉淀应至少用 2 μl 的玻璃珠为好。

(8) 如果回收 DNA 中混有痕量玻璃珠，在含盐缓冲液，例如大多数酶反应的缓冲液中，DNA 可能重新结合到玻璃珠上去。为了确保没有痕量的玻璃珠遗留下来，最好每次使用前稍事离心，并且紧靠着表面吸取所需体积的 DNA 溶液。

(9) 纯化质粒 DNA 时，在含质粒溶液中加入 2 倍体积的 7 mol/L 盐酸胍，并按照每 μg 质粒 DNA 1 μl 玻璃珠糊的比例加入玻璃珠糊，按照 3.3 节第 5 步进行纯化。应该注意用这个方法纯化的质粒是松弛型结构的。

参 考 文 献

1. Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76,** 615–619.

第二十九章　大肠杆菌的转化

Fiona M. Tomley

1. 引　　言

近几年中报道了一些向大肠杆菌中引入外源 DNA 的方法。这些方法都是建立在 Mandel 与 Higa 的一些发现的基础之上的[1]。他们发现将细菌与裸露的噬菌体 DNA 一起放在冷的氯化钙中培养时细菌会将噬菌体 DNA 摄入，并且将混合物作短暂的热休克会大大增加转化效率。以后这个方法被用来向大肠杆菌中引入各种环状与线形的 DNA，并出现了各种旨在提高转化率（或是对于 M13 噬菌体来说，则是转染率）的方法。

转化的机制尚不甚清楚，但转化成功的要点是：须要有多价阳离子存在，在接近于 0℃ 进行保温以及小心控制 42℃ 的热休克。但是即使用了非常有效的方法，可是能成为转化"感受态"的细胞也只限于约总数的 10%。制备好的感受态细胞可以立即使用，也可以分成若干部分后于 －70℃ 冰冻，用时融化。本章主要介绍两种不同的方法：一种是建立在最初的 $CaCl_2$ 方法基础上的快速操作法，另一种是转化效率很高的 Hanahan 法[2]。以下介绍的方法也可以将质粒 DNA 或 M13 噬菌体 DNA 引入感受态细胞中去。

2. 材　　料

2.1　用 $CaCl_2$ 法制备感受态细胞

1）合适的大肠杆菌菌株：例如用蓝白色 β－半乳糖苷酶活性筛选时，宿主菌必须具有5′端缺失的染色体 *lac*Z 基因，而扩增 M13噬菌体载体则必须要有 F′附加体。扩增 M13的菌株我们推荐用 JM101、JM103、JM107、JM109、TG1以及 TG2（参见注释1）。

2）L－肉汤：1%胰蛋白胨，0.5%酵母提取物，200 mmol/L NaCl，分装后高压灭菌。

3）无去污剂的灭菌 1 L 锥形瓶，配有多孔材料的盖子或是棉花塞。具有能放锥形瓶并在 37℃ 剧烈振荡（大约 250 r/min）的旋转式摇床。

4）50 ml 聚丙烯管：例如一次性的 Falcon 2070 或是可重复使用的 Oakridge 管，管子必须无去污剂并经灭菌处理。最好使用有冷冻设备的并能进行 4000 *g* 离心的离心机。

5）100 mmol/L $CaCl_2$：以每份 1.5 ml 的 1 mol/L $CaCl_2$ 贮存于 －20℃，用时化冻，然后稀释至 15 ml，过滤后置冰上冷却（参见注释 2）。

2.2　用 Hanahan 法制备感受态细胞

1）SOB：2% 胰蛋白胨，0.5% 酵母抽取物，10 mmol/L NaCl，2.5 mmol/L KCl、

pH 7.0。按所需的体积分成小份后高压灭菌，临用前加入过滤除菌的 1 mol/L $MgCl_2$或是 1 mol/L $MgSO_4$ 母液至镁离子的终浓度为 20 mmol/L。

2）TFB:10 mmol/L K-MES, 100 mmol/L RbCl 或 KCl, 45 mmol/L $MnCl_2$, 10 mmol/L $CaCl_2$，3 mmol/L 己胺氯化钴。配制成 1 mol/L 的 2－（N－吗啉代）乙磺酸（2－（N-morpholino）ethanesulfonic acid，MES）贮存液后用 5 mol/L KOH 将 pH 值调至 6.3（1 mol/L K-MES)，以每份 10 ml 贮存于－20℃。取 1 份 10 ml 1 mol/L K-MES 加入其他固体盐，配成 1 L TFB，过滤后以每份 15 ml 贮存于 4℃ 可稳定一年以上。非常重要的一点是缓冲液的最终 pH 值应为 6.15±0.1。

3）FSB：10 mmol/L 醋酸钾，100 mmol/L KCl，45 mmol/L $MnCl_2 \cdot 4H_2O$，10 mmol/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$，3 mmol/L 己胺氯化钴，10％甘油。配制 1 mol/L 醋酸钾贮存液，用 2 mol/L醋酸将 pH 值调至 7.2，以每份 10 ml 贮存于－20℃。用一份 10 ml 1 mol/L 醋酸钾加入其他固体盐，并加甘油到 10％配成 1 L FSB，用 0.1 mol/L HCl 将 pH 值调至 6.4，过滤后以每份 15 ml 贮存于 4℃。贮存的过程中 pH 值降至 6.1～6.2 然后稳定下来。如果加入的 HCl 过量时不要回调 pH 值，只能弃去重新配制。

4）DMSO/DTT（参见注释 3)：取一瓶新鲜的、最高级别的 DMSO 分装成每份 10 ml，于－70℃ 贮存在灭菌的密封管中。配制 10 ml 的 DMSO / DTT 时可使用一份 100 ml[1)]的 1 mol/L 醋酸钾（见第 2.2 节，第 3 步)，9 ml DMSO 与 1.53 g DTT，通过耐有机溶剂的滤膜（例如 Millex SR，millipore）过滤除菌后以每份 300 μl 贮存于－20℃。

2.3 转　　化

1）X－gal：20 mg/ml 溶于二甲基甲酰胺，－20℃贮存于暗处。

2）IPTG：24 mg/ml 溶于水中，－20℃贮存于暗处。

3）L－琼脂/抗生素平皿：1％胰蛋白胨，0.5％酵母抽提物，200 mmol/L NaCl，1.2％ bacto－琼脂，以适当的体积分装，高压灭菌。倒皿前用沸水浴或微波炉熔化琼脂，冷却至 50℃ 时加入合适的抗生素（参见注释 4)。将熔化的琼脂倒入置于水平桌面上的平皿中，每平皿约 15～20 ml。待琼脂凝固后将平皿倒置，37℃ 保温数小时使琼脂表面干燥。

2.4 将 M13 DNA 引入感受态细胞

1）H－琼脂：1％胰蛋白胨，140 mmol/L NaCl，1.2％ bacto－琼脂，以所需的体积分装小份后高压灭菌。倒皿前用沸水浴或微波炉熔化琼脂，冷却至 50℃ 左右时加入合适的抗生素。将熔化的琼脂倒在置于水平桌面上的平皿中（15～20 ml/平皿)，待琼脂凝固后将平皿倒置，于使用前 37℃ 保温数小时使琼脂表面干燥。

1）是否有误。——译者注

2）H-上层琼脂：1%胰蛋白胨，140 mmol/L NaCl，0.8% bacto-琼脂，以所需的体积分装小份后高压灭菌。同上法熔化琼脂并于48℃水浴中保温备用。
3）平皿接种所用的细菌：新鲜的50 ml大肠杆菌培养物（菌株同感受态细胞）。应与感受态细胞并列备用。
4）灭菌的、一次性使用的5 ml管，例如Falcon 2054。

3. 方　　法

3.1　用 $CaCl_2$ 法制备感受态细胞

1）从新划种的平皿上挑取一个单菌落或吸取500 μl过夜培养的新鲜菌液，接种到一个盛有50 ml L-肉汤的1 L锥形瓶中。
2）37℃剧烈振荡培养直至菌浓度达到 5×10^7 个/ml，对大多数大肠杆菌菌株来说这时的 A_{600} 值为0.3～0.4。如果从单菌落开始培养至此约需3 h，如从过夜菌液开始培养约需2 h。
3）将培养液转移至一灭菌并已预冷的50 ml离心管中于冰上放置10 min。
4）4000 *g* 离心10 min沉淀细胞，小心地倒去上清液并倒转管子将残余的液体沥干。
5）将细胞悬浮在10 ml冷的0.1 mol/L $CaCl_2$ 中，置冰上5 min，重复第4步操作以沉淀细胞。
6）将细胞悬浮在2.5 ml冷的0.1 mol/L $CaCl_2$ 中，置于冰上备用。

操作到这一步时可将细胞分成小份装在冷的、灭菌的1.5 ml管中，放在液氮中速冻后于-70℃贮存备用。使用时取出迅速解冻后立即放在冰上（参见注释5）。

3.2　用 Hanahan 法制备感受态细胞

1）从新划种的平皿上挑取一个单菌落或吸取500 μl新鲜培养的过夜培养液，接种到50 ml的SOB-肉汤中。
2）37℃剧烈振荡培养直至菌液浓度达到大约每毫升 5×10^7 个细胞(见第3.1节第2步)。
3）将培养液转移到一个灭菌并预冷的50 ml离心管中，冰上放置10 min。
4）4000 *g* 离心10 min后小心地倒去上清液，将管子倒转除去残余的液体。
5）将沉淀悬浮在10 ml冷的TFB中，冰上放置10 min后按照第4步沉淀细胞。
6）将细胞轻轻地悬浮在4 ml冷的TFB中，置冰上备用。
7）加入140 μl DMSO / DTT后立即轻轻地旋转混匀，于冰上放置15 min后再次加入140 μl DMSO / DTT并立即混匀。
8）冰上至少放置15 min后分小份分装在5 ml预冷的管中。

如果制备的细胞准备冷冻贮存，可同样按上述步骤进行，但必须用FSB代替TSB并且使用不含DTT的DMSO。操作至第7步后将细胞分装预冷的5 ml小管放入液氮中

速冻，细胞必须贮存于 -70℃。使用时迅速化冻后置于冰上 15 min。

3.3 转化（参见注释 6）

1）使用前将感受态细胞放在冰水浴中，对大多数实验来说 50 μl 能产生足够的菌落，但如果希望得到大量的菌落，可以使用更多的感受态细胞（参见注释 5 和 7）。
2）小心地向每份细胞中加入体积不超过 5 μl 的 40～400 ng 质粒 DNA 或连接产物，缓慢地混匀（参见注释 8）。转化实验中包括两份对照是非常有用的，一份为含有 5～10 pg的质粒 DNA，另一份不含 DNA。
3）冰水浴中放置 30～45 min。
4）将管子移到 42℃ 水浴中的试管架上，静置 90 s 进行热休克（参见注释 9）。
5）立即将管子放回到冰水浴中，加入 SOB 肉汤（无 Mg^{2+} 离子）至终体积达到 200 μl。如果预期可以得到大量菌落则须将感受态细胞混合物分成二份，180 μl 的一份留在第一个管中，20 μl 的另一份放入第二个管中（参见注释 7）。
6）管子放在 37℃ 保温 50 min。
7）每个样品（200 μl 的体积）中加入 40 μl X-gal 和 40 μl IPTG 后涂布于含抗生素的 L-琼脂平皿上。待干后将平皿倒转，于 37℃ 培养过夜。

3.4 将 M13 DNA 引入到感受态细胞中（参见注释 10）

1）熔化足够的 H-上层琼脂（3 ml/平皿，再多加几毫升）放在 48℃ 水浴中保温。
2）按照 3.3 节中第 1 至第 3 步进行转化操作。
3）热体克前按照每平皿 200 μl 宿主细菌、40 μl X-gal 以及 40 μl IPTG 制备混合物。
4）将感受态细胞/连接物的管子转移到 42℃ 水浴中的架子上，静置 90 s 进行热休克（参见注释 9）。
5）将管子放入冰水浴中，加入 SOB 肉汤（不含 Mg^{2+} 离子）到终体积为 200 μl。如果认为噬菌斑将会太多，可在这时将样品分成若干份（参见注释 7）。
6）在每个样品中加入280 μl 宿主细菌/X-gal/IPTG 混合物。然后每次只操作一个样品：加入3 ml H-上层琼脂后快速混合并倒在已干的 H-琼脂平皿上。注意不要引入气泡。
7）待平皿彻底干后倒转，37℃ 培养过夜（参见注释 11）。

4．注　　释

（1）M13 宿主细菌可在基本培养基（M9）上 4℃ 短期保存。M9 可以维持 F′-附加体，但是必须将 -70℃ 中贮存的菌种中经常在 L-肉汤加 15%甘油平皿上接种传代。
（2）用于制备与贮存的所有转化缓冲液只能用高质量的纯水，例如 Mili-Q 或其他同样的产品。使用经灭菌的、无去污剂的玻璃或塑料器皿，溶液用 0.45 μm 孔径的滤膜（例如 Nalgene 或 Acrodisc 的产品）过滤除菌。
（3）在原始的 Hanahan 方法中 DMSO 和 DTT 溶液是按次序加入的，但是如果两种溶

液一起加入，也会得到同样高的转化效率[3]。

(4) 进行正确的选择是非常重要的，最普通的是用氨苄青霉素进行抗性选择，但是也可以利用卡那霉素抗性和四环素抗性。当使用四环素抗性进行选择时必须要小心，因为有些宿主细菌是利用四环素抗性保持 F′-附加体的，例如 XL-1蓝细胞和 Sure™。

(5) 使用冷冻的感受态细胞比使用新鲜的感受态细胞的转化效率为低，不过除非需要极大量的噬菌斑，否则使用冷冻的细胞不但可行而且非常方便。

(6) 由于质粒使宿主菌对抗生素产生抗性，从而在过夜培养后形成菌落而被选择。还可以利用另外一些质粒选择方法，例如 pUC 与 Bluescript，它们表达 *lac*Z 基因的 α-片段。当带有这些质粒的宿主菌与 IPTG 和 X-gal 一起倒在平皿上时产生蓝色的菌落。把 DNA 片段亚克隆在质粒中而破坏了 α-片段的表达，结果便产生白色菌落。

(7) 每次转化或转染所得到的菌落或噬菌斑数由于各种因素的影响而变化很大，这些影响因素分别是 DNA 的加入量、连接反应中插入片段与载体的比例、连接的效率以及转化的效率。一般来讲闭环质粒 DNA 在用 Hanahan 方法转化时应该得到高于 10^7 个/μg。对照组用 10 pg 的质粒 DNA 转染时应该得到超过 100 个噬菌斑。载体 DNA 线性化后与末端匹配的过量插入片段再行连接后，因连接效率的差异而少得到每 μg DNA $10^2 \sim 10^4$ 个转化子。这样，每次实验转染 40～400 ng 的 DNA 可能取得 40～40 000 个转化子。氯化钙法产生的转化子大致上要低 2～10 倍。用氯化钙处理过的新鲜制备的细菌可于 $CaCl_2$ 中 4℃ 贮存多至 48 h，转化效率在最初的 24 h内提高六倍，以后又下降到原来的水平[4]。

(8) 加入到菌液中的连接的 DNA 体积不能超过总体积的 10%。

(9) 热休克时间的长短是按 Falcon 2504管子标定的，使用其他管子则时间可能有所不同。

(10) M13 DNA 引入到大肠杆菌中的方法与质粒 DNA 完全一样。但不用抗生素进行选择，因为转化细胞与宿主细菌一起涂布在平皿上后当感染了周围的细菌后就会产生噬菌斑（参见第四十一章）。也可以像质粒转化那样使用蓝/白斑选择的方法。注意要做一个与转化平行的宿主细胞倒皿对照。

(11) 在倒入上层琼脂之前底层琼脂必须彻底干燥。

参 考 文 献

1. Mandel, M. and Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J. Mol. Biol.* 53, 159–162.
2. Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166,** 557–580.
3. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Preparation and transformation of competent *E. coli,* in *Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd ed. Plasmid Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 1.74–1.84.
4. Dagert, M. and Ehrlich, S. D. (1979) Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of *Escherichia coli* cells. *Gene* **6,** 23–28.

第三十章　细菌的电击穿孔转化

Lucy Drury

1. 引　　言

利用电场力对细胞的可逆性穿透（电击穿孔）已经成为向真核与原核细胞中转移DNA的有效技术。很多种类的细菌可以成功地被电击穿孔[1]，并且大肠杆菌的很多菌株用电击法转化时通常1 μg DNA能得到10^9～10^{10}个转化子。转化效率可高达存活细胞的80%，并且当DNA的浓度接近每毫升10 μg转化DNA时转化也能成功[2]。

能得到如此高转化效率的优点是很明显的。例如质粒文库，由于质粒DNA小并且可塑性强，所以用质粒构建基因文库的方案更为可取。此外对于真核生物中应用穿梭质粒进行转染也是非常有价值的。化学法诱发感受态的方法不能产生足够高的转化率来构建基因文库。

一些商品化的仪器可以提供方波脉冲或是指数脉冲。由于大部分发表的数据是使用指数脉冲波得到的，所以下面的讨论也限于这种脉冲形式。指数脉冲是由电容器放电所产生。电压（随时间）的衰减是时间常数τ的函数。

$$\tau = RC \tag{1}$$

式中R是电阻，以欧姆为单位；C是电容，以法拉第为单位；τ是时间常数，以秒为单位。施加于细胞悬浮液两端的电势对于任何一个细胞来讲是电场强度（$E = V/d$，式中d为两个电极之间的距离）和细胞长度的函数。在细胞膜的两端产生一个电位，一旦细胞膜上所产生的电位超过一定的限度时膜就发生局部的破裂，从而导致外界分子渗透进入细胞。只要电场的大小与持续时间都不超过一定的限度，细胞膜上所产生的通透性便是暂时的，否则细胞就产生不可逆的破损。由于电场的强度与细胞的大小呈反比关系，所以对于相同的通透性来讲原核细胞比真核细胞须要用更高的场强。如果电压以及随电压而变的电场强度下降，就需要较长的脉冲时间方能达到最大的转化效率，但是这种补偿的范围是有限的[2]。增加场强导致细胞的存活率降低，而最大的转化效率往往只能在细胞存活为30%～40%时才能达到。

本章叙述并讨论细菌的电击转化法，特别是有关大肠杆菌的资料。

2. 材　　料

2.1　电击感受态细胞的制备

1) 合适的大肠杆菌菌株：作者所测试过的菌株在用电击法转化中都取得了比化学诱导法更高的转化率。参考文献1中就是一些曾成功地应用于电击转化法的菌株。

2）L-肉汤培养基：1% bacto-胰蛋白胨，0.5% bacto-酵母抽提物，0.5% NaCl。
3）0.1 mmol/L HEPES、pH 7.0，可用蒸馏水代替。
4）蒸馏水：高压灭菌。
5）10%甘油（v/v）：用灭菌的蒸馏水配制。

2.2 感受态细菌的电击穿孔

1）电击仪：转化实验需要高压的电击装置，例如 Bio-Rad（Richmond，CA）公司的带有脉冲控制的基因脉冲仪，以及放置细菌悬液的小杯，杯中电极距离为 0.1 cm 或 0.2 cm。
2）TE：10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，1 mmol/L EDTA。
3）SOC：2% bacto-胰蛋白胨，0.5% bacto-酵母抽提物，10 mmol/L NaCl，2.5 mmol/L KCl，10 mmol/L $MgSO_4$，20 mmol/L 葡萄糖。

3. 方　　法

3.1 感受态细菌的制备

1）从已选定的大肠杆菌菌株的新划线的琼脂平皿开始。
2）挑取一个单菌落接种于 L-肉汤培养基或其他合适的营养丰富的培养基中，培养过夜。
3）次日取 10 ml 过夜培养的菌液接种至 1 L L-肉汤培养液中，于 37℃ 中在良好通气的条件下继续培养，快速生长的细胞可以得到最佳结果（参见注释 1）。
4）当培养液的 OD_{600} 达到 0.5～1.0 时置于冰上。不同菌株的最适菌浓度是不同的，但作者发现 OD 值在 0.5 时往往能得到最好的结果。
5）冰上放置 15～30 min。
6）4℃ 中以 4000 *g* 离心 6 min，倒去上清液。
7）再次将细胞悬浮于等体积的 0.1 mmol/L HEPES 缓冲液中，缓冲液预先在冰上冷却（参见注释 2）。
8）在 4℃ 中离心沉淀细胞并再次悬浮于 1/2 倍体积的 HEPES 中，由于细胞在低离子强度的溶液中形成的沉淀很松，所以操作必须非常小心。
9）4℃ 中再次离心收获细胞并再次悬浮于 20 ml 冰冻过的 10% 甘油中。
10）最后一次离心收集细胞并悬浮于 2～3 ml 10% 的甘油中。细胞的终浓度应在 3×10^{10} 个/ml 左右。

细胞可以立即使用或者用干冰速冻后于 -70℃ 保存，细胞可以在大约 6 个月内保持感受态，细胞在数次冷冻与解冻后只有少量的活力损失（参见注释 3）。

3.2 感受态细菌的电击穿孔

1) 将样品杯及杯架放在冰上冷却（参见注释 4）。
2) 将仪器调节到适当的参数，例如电容为 25 μF，电压为 1.8 kV 或 2.5 kV（指分别使用 0.1 cm 或 0.2 cm 的样品杯时）。将脉冲控制单位设定于 200Ω。
3) 将冷冻的一部分细胞在冰浴中解冻或使用新制备的细胞（也应置于冰浴中）。
4) 冷却的1.5 ml 聚丙烯管中加入40 μl 细胞悬浮液(用0.2 cm 的样品杯时则加入45 μl，参见注释5)和1～5 μl 溶于水或是低离子强度缓冲液如 TE 的 DNA 溶液。混匀后在冰上放置约1 min(参见注释6～9)，再延长冰浴放置时间并无好处(参见注释10)。
5) 将细胞与 DNA 的混合液转移到一个冷的电击样品杯中，如有必要可轻轻拍打使悬浮液处于样品杯的底部。
6) 在以上设置的条件下施加一个脉冲，所产生的时间常数为 4.6～4.8 ms（样品杯为 0.1 cm 时场强为 18 kV/cm，0.2 cm 的样品杯则是 12.5 kV/cm）。
7) 立即加入 1 ml SOC 培养液至样品杯中（置于室温）。重新悬浮细胞并转移到 17 mm × 100 mm 的聚丙烯管中，37℃ 培养 1 h（参见注释 11），在培养时间内以 225 r/min 摇动管子可提高转化子的得率。
8) 以合适的稀释度涂布于选择性平皿上。

可能碰到的问题在注释 12～16 中进行讨论。

4. 注　　释

(1) 若要得到高度（电击）感受态的大肠杆菌细胞必须使它快速生长，并在对数期早期至中期收集。始终将细菌保持于 4℃，并应尽可能快地进行操作。
(2) 洗涤细菌并将其悬浮于低离子强度的溶液中是非常重要的，因为这样可以防止样品杯中由于电穿孔所需的高压而发生电弧放电。
(3) 10％的甘油溶液能在 －70℃ 为大肠杆菌提供理想的低温保护。细胞悬浮液分成小份装在预冷的 1.5 ml 聚丙烯管中后置于干冰中冷却，但是在液氮中快速冷却可能有害[3]。在冰中小心进行几次融化-冰冻的过程对细胞的感受态水平看来没有太大的影响。
(4) 由于电击时须使用高场强，所以对大多数细菌来讲电穿孔最好在 0～4℃ 进行。当电穿孔在室温进行时效率要降低 100 倍，这可能与膜的状态有关或者可能是在脉冲过程中产生了过多的热量所致[4]。
(5) 当使用电极距离为 0.2 cm 的样品杯时 40 μl 的细胞悬浮液正好将杯底盖没。最好使用 45 μl 的细菌悬浮液，这样能防止吸量的误差。样品杯中液体不足时容易发生电弧放电。
(6) 转化效率可以通过改变细菌悬浮液的浓度来进行调节。细菌的浓度从0.8×10^9 个/ml提高到 8×10^9 个/ml 时转化效率可提高 10～20 倍[4]。实验证明当细菌的浓

度提高到 2.8×10^{10}个/ml 并使用固定的 DNA 浓度时转化子数稳步提高[3]。

(7) 引入细胞的转化 DNA 必须放在低离子强度的溶液中，注释 2 中提到高离子强度的溶液使杯中产生电弧放电或是很短的脉冲时间，从而造成细胞的死亡和导致样品的损失。例如 CsCl 或醋酸铵之类的盐离子浓度必须控制在 10 mmol/L 以下。最好是将 DNA 溶于 TE 或水中。这一点在连接反应之后特别重要，因为连接缓冲液中的离子强度非常高，不能直接用于电击。DNA 必须用乙醇/醋酸铵进行沉淀（沉淀时加入载体 tRNA 不会影响转化频率）。或者连接液可以按照 1/100 稀释后取 5 μl 用于电击转化[5]。

(8) 电击时转化 DNA 的浓度直接与被转化细菌的百分比有关。对于大肠杆菌这个百分比可以适用于几个数量级范围中，当 DNA 达到高浓度（直至 7.5 μg/ml）时大约 80%的存活细胞可以转化成功[2]。这与化学处理的感受态细胞不同，在化学法中 DNA 浓度低 100 倍时已经饱和，这时只有小部分细胞处于感受态而被转化[6]。对于要求高效而低频的转化（例如构建基因文库时不希望有共转化子的），小于 10 ng/ml的 DNA 浓度和小于 3×10^{10}的细胞浓度是比较合适的。相反地，如果需要高频转化，可以用 1～10 μg/ml，这样可以转化大部分存活细胞[2]。

(9) DNA 分子的大小与拓扑构型可以影响转化效率。有报道认为大至 20 kb 的质粒与 3 kb的质粒的摩尔转化效率相同，并且当这些质粒转变为松弛型时并不影响他们的转化活性。较大的分子能被吸入但效率极低，例如线型 λ DNA（48 kb）的摩尔转化效率仅为小分子质粒的 0.1%[2]。对于具有相同复制起点、相同启动子与相同基因标记但大小不同的大肠杆菌质粒的直接比较未见文献报道，但是在我的经验中不同构造的质粒具有不同的摩尔转化效率。Powell 等[7]比较了乳酸链球菌（*Streptococcus lactis*）中有关的质粒的吸入，认为质粒的大小与摩尔转化效率之间没有明确的关系。

(10) 转化过程中并未发现 DNA 结合在细胞表面的证据，因此增加电击前的保温时间至 30 min 对转化结果没有什么影响[2]。为了支持这一观察，Calvin 等[8]做了这样的实验：将细胞与放射性标记的质粒混合，洗涤两次后发现只有少量的放射性物质仍结合在细胞上。某些种类的细菌，例如干酪乳酸杆菌（*Lactobacillus casei*）能分泌核酸酶，因此增加电击前的保温时间可能有害[9]。

(11) 电击后的大肠杆菌是非常脆弱的，迅速加入恢复生长的培养基可以大大增加其活力和转化效率。甚至迟一分钟加入，转化效率就会降低 3～5 倍，若迟至 10 min 后加入，转化效率会降低 20 倍[2]。电击后恢复生长对于表达转化质粒所引入的抗性基因也属必要，通常需要 1 h。

(12) 有一些原因会造成样品杯中电弧放电，其中一个原因可能是 DNA 溶液或是细菌悬浮液的离子强度太高。非常重要的一点是 DNA 应悬浮于 TE 或水中。若是连接混合物则必须用 0.3 mol/L 的醋酸钠和 2～3 倍体积的乙醇沉淀，或者在 TE 或水中稀释 10～100 倍。如果细胞/DNA 混合没有到达样品杯的底部或是样品杯中溶液太少时也会发生同样的问题（参见注释 5）。

另一个可能的原因是样品杯与腔室在冰上冷却时残留在表面的水分引起电弧。当须要电击处理很多样品时不必在每一次脉冲后冷却样品杯架，但最好在做了几

个样品后把杯架擦干，因为冷凝水会积累而造成电弧放电。

(13) 若转化后得不到菌落，问题可能出在细菌上或是 DNA 上。建议准备好大量精确稀释的超螺旋质粒，例如 pUC18，以便在所有的实验中都以此作为正对照。用这种方法可按常规检验制备的细菌（若制备的细菌具有 1μg DNA 转化 10^9 个转化子的转化效率，那么 5 pg 超螺旋的 DNA 能够得到大约 10 000 个转化子）。

如果正对照中不能得到转化子，就要检查细菌的培养与收获条件是否都是正确的。更高感受态细胞是在对数早期至对数中期内收获的快速生长的细菌。操作时所有的洗涤液保持在 4℃，收集菌体时也要保持在冷的状态下。在处理一个新的菌株时最好在 OD_{600} 为 0.4～1.0 时收获，我们发现最佳菌浓约在 0.5 左右。

如果电击处理的感受态细胞曾保存在 −70℃，那么必须肯定它们仍是活的，可以用合适稀释度涂布于非选择性的培养基上测试存活数。

如果转化细菌只出现在对照中，则应先检验所使用 DNA 的浓度，也可能 DNA 中含有酚或 SDS 等有毒的杂质。电击后细胞的存活率可以用涂布在非选择性皿上的方法来测定。若使用第 3 节中列出的参数可望达到 30%～40%的存活率，但同时也应用对照 DNA 转化同量细菌来核实。如果 DNA 已被污染可沉淀后用 70%的乙醇洗涤或用玻璃珠法（参见二十八章）抽提 DNA 去除不要的化学物质。

(14) 如果发现已经测定过电击感受态的一批新近制备的细胞的转化效率下降了，那么问题可能出在电击穿孔这一步。非常重要的一点是样品杯与杯架必须冷却，使细菌在开始电击时保持在 0～4℃ 。至关重要的是在电击后立即加入恢复生长的培养基（在室温保存）。另一可能的情况是保存细菌的条件未能保持恒定，例如冰箱的温度不能维持不变。

(15) 对于未曾预料到的高转化效率有多种可能的解释，最简单的解释是抗性皿已经过期。此外因为细胞是高感受态的，DNA 的污染也会成为问题。非常重要的一点是要使用无菌操作技术并且要仔细使用微量移液器，防止上次实验中的 DNA 与本次实验造成交叉污染。由于电击法可使细胞释放质粒，所以前一次转化的细菌所造成的污染效应将大大升高，特别是当污染的细菌含有高拷贝的质粒时。

(16) 大肠杆菌转化中遇到的上述的一些问题如果在其他细菌的转化中也遇到时，可能是由于该细菌的特殊性质。例如如果转化的细菌有荚膜，它就可能阻碍 DNA 的进入，某些种类的细菌还会分泌核酸酶降解 DNA，某些类型的细菌须要较长的恢复时间或在较长时间后才能表达选择性标记。如果细胞的大小不寻常时可能在电击时须要用到与常规不同的场强。建立应用于一种新的细菌的电击条件，最好参照类似细菌（参考文献 1 中所列的材料）的常规参数，然后在此基础上进行优化。

参 考 文 献

1. Bacterial species that have been transformed by electroporation (1990) Bio-Rad Laboratories, 1414 Harbor Way South, Richmond, CA 94804. Bull. 1631.
2. Dower, W. J., Miller, J. F., and Ragsdale, C. W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* **16,** 6127–6145.

3. Dower, W. J. (1990) Electroporation of bacteria: a general approach to genetic transformation, in *Genetic Engineering,* vol. 12 (Setlow, J. K., ed.), Plenum, New York, pp. 275–295.
4. Shigekawa, K. and Dower, W. J. (1988) Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. *Biotechniques* **6,** 742–751.
5. Willson, T. A. and Gough N. M. (1988) High voltage *E. coli* electrotransformation with DNA following ligation. *Nucleic Acids Res.* **16,** 11,820.
6. Hanahan, D. (1995) Techniques for transformation of *E. coli,* in *DNA Cloning. A Practical Approach,* vol. 1, 2nd ed. (Rickwood, D. and Hames, B. D., eds.) Oxford University Press, New York, pp. 1–36.
7. Powell, I. B., Achen, M. G., Hillier, A. J., and Davidson, B. E. (1988) A simple and rapid method for genetic transformation of *Lactic streptococci* by electroporation. *Appl. Environ. Microbiol.* **54,** 655–660.
8. Calvin, N. M. and Hanawalt P. C. (1988) High efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* **170,** 2796–2801.
9. Chassy, B. M. and Flickinger, J. L. (1987) Transformation of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **44,** 173–177.

第三十一章　应用碱裂解法制备质粒 DNA

Etienne Joly

1. 引　　言

质粒的“微量抽提”方法很多，几乎是有多少分子生物学实验室便有多少个“微量抽提”法。以下的方法是从 Birnboim 与 Doly[1]发表的碱裂解法衍生而来的，它在 1982 年版的《分子克隆实验操作手册》中已略加修改[2]。这个方法通过 NaOH 与 SDS 裂解细胞，然后用高浓度的醋酸钾中和，结果使细菌的染色体 DNA 与其他高相对分子质量的细胞结构选择性地沉淀下来，留在上清液中的质粒 DNA 用异丙醇沉淀。

以后引入了一些简化的方法，而且多数液体可以用重复加样的移液器吸取。如果仅抽提几个样品并且使用最简单的方法，那么可以在 10 min 内从 2 ml 的培养液中抽提到大于 20 μg 的纯度足以用于酶切的质粒 DNA。在初步鉴定后可以用 RNase 进一步纯化部分或全部样品并用有机溶剂抽提。这种进一步纯化的 DNA 适用于亚克隆、测序、放射性同位素标记甚至用于真核细胞的转化。这一操作可以放大至“大量抽提”法制备大量的质粒 DNA。如果需要极高纯度的制品，则可再用氯化铯/溴化乙锭密度梯度离心法去除痕量的污染染色体 DNA。

2. 材　　料

2.1　小规模质粒 DNA 的制备

1）TB 细菌培养基：将 100 ml KP 溶液与 900 ml pre-TB 溶液混合。KP 溶液的配方是 2.31 g KH_2PO_4，12.54 g K_2HPO_4，加蒸馏水至 100 ml。pre-TB 溶液的配方为：12 g bacto-胰蛋白胨，24 g bacto-酵母提取物，4 ml 甘油，加水至 900 ml。这两种溶液必须分别灭菌。使用时加入合适的抗生素。

2）灭菌试管：必须大于 10 ml，保证培养细菌时有良好的通气条件。

3）适用于微型离心机的 1.5 ml 离心管和一个大的金属架子，作者所用为有金属线网的架子，能容纳直径为 13 mm 的管子。

4）可重复加样的上装针筒的移液管：例如 Eppendorf 组合吸嘴，可吸取 50、100 以及 250 μl 液体，每种液体配一个一次性的针筒，可以使用数百次。

5）细菌悬浮液（BRS）：50 mmol/L 葡萄糖，50 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，10 mmol/L EDTA，保存于 4℃ 中以防止污染。

6）裂解液（LS）：200 mmol/L NaOH，1% SDS，室温贮存。

7）中和液（KoAc）：3 mol/L K^+/5 mol/L Ac^-。100 ml 溶液中含有 29.4 g 醋酸钾，

88.5 ml水以及 11.5 ml 冰醋酸，室温贮存。

8）异丙醇。

9）70% 乙醇。

10）TE：10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，1 mmol/L EDTA。

11）RNase A：购买冷冻干燥的粉剂（Sigma，［St，Louis，MO］，R9009）。配成 10 mg/ml的水溶液后于沸水中放置 10 min 消除残余的 DNase 活力。分装小管于 −20℃贮存。

2.2 质粒的纯化

1）0.4 mol/L 醋酸铵。

2）酚/氯仿/异戊醇：按 25:24:1 的比例混合 TE 平衡过的酚、氯仿和异戊醇。4℃贮存以减少氯仿的挥发。

3）氯仿/异戊醇：氯仿和异戊醇的比例为 24:1。4℃贮存以减少氯仿的挥发。

4）100% 乙醇。

2.3 质粒 DNA 的大量抽提

1）大三角烧瓶：体积大于 2 L 的三角烧瓶，高压灭菌。

2）500 ml 的离心罐（也可选择 250 或是 100 ml 的）以及合适的转头与离心机。

3）$T_{50}E$：50 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，10 mmol/L EDTA。

4）一次性的 10 ml 聚丙烯管。

5）氯化铯：选择纯度为分子生物学级的氯化铯，但没有必要选用超纯级的试剂，因为超纯试剂的价格过于昂贵，比分子生物学级贵两倍多。

6）溴化乙锭（EB）：配成 10 mg/ml 的水溶液。EB 是强烈的诱变剂，操作时必须戴上手套，使用过的手套必须正确处理[2]。

7）超离心管：快封口管子和热封口器（Beckmann，Palo Alto，CA）。

8）针筒与针头：2 ml 针筒和 19 号针头。

9）水饱和的丁醇（WSB）。

10）30 ml 离心管（例如 Corex），合适的转头与离心机。

3. 方　　法

3.1 质粒 DNA 的小量抽提

在亚克隆中往往必须用限制性内切酶切割质粒 DNA 的方法对大量含有质粒的菌落进行筛选。在这种情况下就须同时进行快速而小量的质粒 DNA 抽提。

1）挑取不同的单菌落分别接种于 2 ml 灭菌的 TB 培养液中（参见注释 1）。盖上盖子于 37℃振荡过夜。

2）将每一试管中的培养液倒入贴上标签的 1.5 ml 管中，放入微型离心机以 12 000 *g* 离心 30 s 细菌将形成压紧的奶油状沉淀。

3）倾滗去除上清液，将管子垂直置于管架上数秒钟（即倾滗其余小管所需时间）。积在管底的最后一滴液体可用一细口的滴管或 200 μl 的吸嘴接在真空系统上吸去。

4）用重复使用的移液管在每一管子中加入 100 μl 的 BRS 溶液后盖上盖子，将每个管子与金属架子摩擦以重新悬浮细菌（参见注释 2）。

5）用重复使用的移液管在每个管中加入 200 μl 的 LS 溶液，反复倒转管子并用手摇动数秒钟使内容物混合（参见注释 3 与 4）。溶液应该很快从混浊变为透明，表示细菌已经及时地裂解了。裂解至少进行 3 min。在打开盖子前须静置 30 s 使黏稠的液体回到管底。

6）用重复使用的移液管在每个管子中加入 150 μl 的 KOAc。按第 5 步操作摇动管子。生成的白色沉淀中含有细菌的染色体 DNA、大部分 SDS 以及很多其他不需要的细菌成分。在微型离心机中全速离心 2～5 min。

7）同时将一组新的管子贴上标签，每管中加入 250 μl 异丙醇。

8）从离心机中取出管子小心地放在架子上，使白色沉淀仍黏附于管壁上，用 1 ml 可调移液管吸去上清液，尽可能不要吸到白色的沉淀（参见注释 5）。吸出的液相放在盛有异丙醇的一组干净的管子中。

9）盖上盖子后在涡旋振荡器上振荡数秒钟，通常会形成乳白色沉淀。12 000 *g* 离心 30 s后质粒 DNA 形成白色的沉淀。

10）倒去上清液，加入 750 μl 70％的乙醇洗涤沉淀，稍稍涡旋振荡后离心 30 s。倒去乙醇后再次离心 10 s 使剩余的乙醇沉到管底。小心地抽气除去液体，管子于空气中干燥 1～5 min。

11）每管中加入 50 μl 的 TE 悬浮沉淀（参见注释 6）。

如果抽提的是高拷贝的质粒并且得率也良好，那么 2～3 μl 的 DNA 溶液已足够进行酶切与电泳分析了。酶切体系中加入 RNase（每个酶切样品中加 1 μg）以便在电泳前去除污染的 RNA。另外也可以用一种比较繁琐的方法在质粒 DNA 的制备过程中去除 RNA（参见注释 7 与 8）。

3.2 质粒的纯化

用凝胶电泳鉴定质粒 DNA 的质量后可能还有进一步的工作要做，如测序、亚克隆以及 DNA 介导的基因转移，为此还须对 DNA 再次进行纯化。

1）每份小量制备物中加入 50 μl 4 mol/L 醋酸铵，内含 200 μg/ml RNase A，室温放置 20 min。

2）每份 DNA 样品中加入 100 μl 的酚/氯仿，稍稍涡旋振荡后 12 000 *g* 离心 2 min。将上层液体（含有 DNA）吸至一个干净的含有 100 μl 氯仿的管子中（参见注释 9）。

3）稍稍涡旋振荡后 12 000 *g* 离心 2 min，再次将含有 DNA 的上清液吸到一个干净的

含有 200 μl 100％乙醇的管子中。

4）稍稍涡旋振荡促使 DNA 沉淀，室温离心 5 min。

5）用 70％ 乙醇淋洗，稍事离心，抽气除去剩余乙醇后空气干燥 5 min。

6）用 50 μl 灭菌的 TE 溶解 DNA。

3.3 质粒 DNA 的大量制备

大量制备质粒 DNA 时可以使用放大了的小量制备方法。

1）接种 250～500 ml 的 TB 培养液，37℃振荡过夜。

2）将培养液转移到一个合适的离心罐中（例如 Beckman 355607 离心罐），5000 *g* 离心 5 min。

3）倒去上清液，倒转离心罐几秒钟沥干液体，或用干净的滴管接在真空系统上吸去液体。

4）将菌体重新悬浮在 20 ml 的 BRS 溶液中。

5）在 40 ml 的 LS 溶液中裂解细胞。用手摇动并于室温放置 10 min。

6）用 30 ml 的 KOAc 中和上述溶液。用手摇动，开始时要缓慢，到最后要剧烈地摇。应有白色的沉淀形成。

7）4℃中以 6000 *g* 离心 10 min，将液相转移到一个干净的含有 55 ml 异丙醇的离心罐中，移取液体时使用 25 ml 的移液管，尽量不要将白色的沉淀吸入。

8）涡旋振荡后以 6000 *g* 在室温中离心 5 min，用 10 ml 70％乙醇洗涤沉淀，再次离心 5 min。倒去上清液，用接在真空系统上的滴管抽气除去剩余的痕量乙醇。

9）再次将沉淀悬浮于 4 ml $T_{50}E$ 中。置于 37℃摇动可促进沉淀的悬浮（参见注释 10）。

10）将体积准确地调整到 4.5 ml（参见注释 11）并转移到 10 ml 的一次性聚丙烯管中。准确加入 5 g CsCl，待溶解后加入 500 μl EB。

11）以 4000 或 5000 r/min 离心 10 min 除去紫色的沉淀物，并用滴管将溶液转移至一个 5 ml 的快速封口型超离心管中。

12）封住管口（参见注释 12），在 16℃中以 200 000 *g*（45 000 r/min）离心 10 h 以上。离心结束后小心地取出管子并将其牢牢夹住。质粒 DNA 浮在管子的中部形成一红色的条带（参见注释 13）。离心过程中 RNA 沉下并集聚在管子的外侧，而蛋白质则悬浮并集聚在管子的内侧。

13）用针头在管子的顶部穿刺使形成一气孔。用带针筒的针头在质粒 DNA 条带下缘穿刺，避免碰到 RNA 与蛋白质沉淀。将针头的末端正好与质粒 DNA 条带的底部接触并缓慢地将其吸入针筒中。在收集体积尽可能小的情况下（<1 ml）尽量地收集这一条带。

14）从离心管上拔下针头，千万注意这一操作一定要在合适的容器上方进行，因为管里剩余的液体会从孔中流出。将含有 EB 的 DNA 溶液转移到微型离心管中。

15）离心管中加入 WSB 至满，稍加涡旋振荡后离心数秒钟。EB 主要分布在丁醇相中，呈紫色。弃去丁醇相。依据质粒的量重复抽提 4～7 次（参见注释 14）。待水相中看不出红色后再抽提两次的做法可以视为一个基本准则。

16) 将水相转移至 30 ml 的离心管中，加入 TE 至 5 ml。加入 10 ml 100% 乙醇后涡旋振荡，置于 -20℃ 10 min 或更长的时间。4℃ 中以 12 000 g 离心 10 min。用 70% 乙醇淋洗沉淀，空气干燥后溶于 500 μl 的 TE 中（参见注释 14）。

4. 注　　释

(1) 将过夜生长的 2 ml 菌液倒入（而不是吸入）1.5 ml 的 Eppendorf 管中，这样操作可以节约时间与吸嘴。剩余未倒出的菌液足够冰冻保存或是作为大规模培养的种子。

(2) 将小管在金属试管架底部的网上摩擦 2～3 次便可使沉淀浮起来，也使操作过程中添加一些音乐感。非常关键的一点是要等到细胞彻底悬浮后方能加入裂解液。

(3) 在这个阶段不能涡旋振荡，因为振荡会剪断染色体 DNA 而且使制备物肮脏难看。

(4) 用空着的一只手盖在管子上方握住所有的管子，这样可以同时操作全部小管。

(5) 由于有些沉淀是浮着的，所以最好使用移液器和一次性吸嘴吸出而不要采取倒出上清液的办法。

(6) 笔者的经验，对每个管子使用一个干净的 200 μl 吸嘴并将其留在管中是一个最经济的方法，这个吸嘴以后还可以将液体吸上吹下数次使 DNA 充分悬浮，最后还可用于吸取部分样品作酶切之用。

(7) 以下的操作步骤较长，但可以得到比较纯净并且不含 RNA 的 DNA，在这一操作步骤中用 100 μg/ml 的 RNase A 取代了 BRS 中的葡萄糖，溶液仍然贮存于 4℃，除以下不同之处外其余均与原步骤相同：

a. 细菌悬浮在 300 μl 的 BRS-RNase 溶液中，用 300 μl LS 液裂解，室温放置 15～20 min 使 RNase 彻底作用。

b. 裂解液用括号中配方的 300 μl KoAc（2.55 mol/L 醋酸钾，用醋酸将 pH 值调至 4.8）中和。

c. 用 500 μl 异丙醇沉淀质粒 DNA。

(8) 另一个获得较纯 DNA 的方法是在 4℃ 中将用醋酸钾沉淀的 DNA 离心 5～10 min，不过这一改进是非常有限的。

(9) 笔者认为做酚/氯仿抽提时最为经济的办法是在转移 DNA 之前先将氯仿或乙醇置于一干净的管子中。这样可以使用同一个吸嘴将样品加入全部管中而不用担心交叉污染。

(10) 比氯化铯密度梯度离心法快速但制备物较不纯净的一种方法是用 RNase 处理 DNA，然后用酚/氯仿抽提。加入 RNase A 与 NaCl 至终浓度分别为 100 μg/ml 与 100 mmol/L，37℃ 保温 30 min，用 4 ml 酚/氯仿抽提，然后再用 4 ml 氯仿抽提，最后用 8 ml 100% 乙醇沉淀 DNA。在涡旋振荡器上振荡后 8000 r/min 离心 10 min，用 5 ml 70% 乙醇淋洗一次，离心除去剩余的液体，沉淀于空气干燥后溶于 1 ml TE 中，取 1 μl 在琼脂糖胶上电泳估计浓度及产量，如有必要可再行稀释。另一种方法是使用硅藻土柱（详见第三十三章）。

(11) 为了使质粒 DNA 形成条带，非常重要的一点是建立一个具有正确的初始密度的

CsCl/EB 溶液。在称取 CsCl 的质量与量取溶液的体积时应该做到非常精确。一支 10 ml 的移液管就能方便地测量溶液的总体积，如果使用不同超离心管时体积也很容易调整。为了得到正确的浓度可以使用这样的规则：1 ml 水溶液中加入 1 g CsCl。

(12) 如果氯化铯溶液的比重是正确的（1.55 g/ml），那么一支 5 ml 快封管的质量应该接近 9.5 g。

(13) 如果质粒 DNA 量较少（<100 μg）最好用手提式长波紫外线灯观察，条带可以看得比较清楚。紫外线灯照射的时间越短越好，因为紫外线会损伤 DNA。

(14) 只要你有一些经验，就可以根据密度梯度条带的亮度估计出 DNA 的含量，并且可以用 TE 调整到所需要的体积（在多数情况下 1 μg/ml 是很合适的）。

参 考 文 献

1. Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7,** 1513.
2. Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 368,369.

第三十二章　应用快速煮沸法制备小量质粒 DNA

Adrian J. Harwood

1. 引　　言

除了碱裂解法[1]（参见第三十一和三十三章）外另一种经典的制备质粒 DNA 的方法是 Holmes 与 Quigley[2]提出的、通常所称的快速煮沸法。这个方法的原理与碱法抽提的原理完全相同。细菌局部裂解，质粒 DNA 从中逸出，而大部分的染色体 DNA 则包裹在细胞碎片内一起被离心除去，剩下的染色体 DNA 可以在变性后快速复性的过程中去除。这里的变性步骤是用高温处理而不是用高 pH 值。由于质粒分子的超螺旋结构，在上述的条件下会很快地复性，而染色体 DNA 仍处在变性状态，不会出现在以后的乙醇沉淀中。

对于抽提为数众多的小量质粒 DNA（小量制备），这是一个快速而又方便的方法。所得到的 DNA 的质量很好，可以直接用于酶切或亚克隆。如须作为测序模板只须进一步加工即可。但是对于大量抽提，煮沸法就不方便而碱裂解法比煮沸法更为合适。

2. 材　　料

1）STET：5% Triton X－100，50 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，50 mmol/L EDTA、pH 8.0，8%蔗糖。可于室温贮存。
2）溶菌酶：干粉，于－20℃贮存。
3）异丙醇。
4）70% 乙醇。
5）TE：10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，1 mmol/L EDTA。
6）沸水浴：煤气灯上加热烧杯中的水即可。加热时需要一个无底的管架，因为管子必须直接接触水浴，达到快速加热的目的。

3. 方　　法

1）对于每一份小量制备，准备一份细菌培养物，取单菌落接种到含合适抗生素（例如 100 μg/ml 的氨苄青霉素）的 L-肉汤中，37℃剧烈振荡培养过夜（参见注释 1）。
2）在开始抽提前准备好沸水浴与新鲜配制的 1 mg/ml 的溶菌酶/STET 溶液。
3）将培养物倒入 1.5 ml 离心管中。12 000 *g* 离心 1 min 沉淀细菌（参见注释 2）。用接在水泵上的尖头滴管小心地吸出上清液。

4) 在涡旋振荡器上振荡数秒钟振松菌块，每个管中加入 200 μl 的 STET，这时再行振荡后沉淀应该很容易被悬浮起来（参见注释 3）。
5) 立即将管子插在无底的管架上，在沸水浴中准确放置 45 s，保证每个管子至少有一半高度是浸没在水中的。
6) 12 000 g 离心 10 min，这时应该形成一大块松散的并且有些黏稠的沉淀。
7) 用木质牙签将管中的沉淀捞出，由于沉淀很滑所以要在管口处准备一块纸巾以便“抓”住沉淀，防止沉淀再次滑向管底。
8) 每个管子中加入 200 μl 异丙醇，12 000 g 离心 5 min。
9) 抽气吸去上清液后用 500 μl 70％乙醇洗涤沉淀。离心 1 min 使沉淀压紧，抽气吸去 70％的乙醇。
10) 空气干燥 10 min 后用 100 μl TE 溶解每个管中的沉淀。使用前涡旋振荡并摇动 10 min以保证沉淀彻底溶解。
11) 每一次酶切与电泳检测时取用 2～10 μl（对大多数载体来说相当于 100 ng 的质粒）。

4. 注　　释

(1) 高拷贝质粒的培养时间可缩短至 6 h，这样整个过程就可以在一天之内完成。
(2) 较短的离心时间可以使沉淀不至于压得过紧，使沉淀的重新悬浮更易于进行。
(3) 如果沉淀不易悬浮，可以用吸嘴吸放溶液使沉淀松动，但不要将沉淀直接吸入吸嘴中。

参 考 文 献

1. Holmes, D. S. and Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114,** 193–197.

第三十三章 应用硅藻土制备质粒 DNA

Laura Machesky

1. 引 言

碱裂解法纯化质粒 DNA 是分子生物学技术中最常用的方法之一。传统上纯度最高的质粒 DNA 是用 CsCl 密度梯度离心法将 DNA 分带制备而得。但是这种方法很费时并且价格昂贵，因此都在找寻另外的纯化 DNA 的方法。其中之一就是使用越来越广泛的硅胶吸附 DNA 的方法。这种材料可以购买到，但在实验室中也很容易制备。本章介绍硅藻土法大规模抽提质粒 DNA 的操作步骤。这个方法是根据 Boom 等人[1]和 Carter 与 Milton 的工作[2]以及 TIBS[3]中推荐的“土法”纯化 DNA 试剂盒的资料。尽管这是一个大量制备方法，DNA 产量是毫克级，但也能适用于小量制备得到微克级的质粒 DNA[2]。

2. 材 料

所有试剂都要用灭菌的蒸馏水配制，除了特别注明外所有的试剂均于室温贮存。

2.1 质粒 DNA 的制备

1）2×TY：在 1 L 水中溶解 16 g bacto-胰蛋白胨，10 g 酵母抽提物和 10 g NaCl。高压灭菌。
2）500 ml 与 250 ml 离心瓶高压灭菌，或者用 1 mol/L 的 NaOH 洗涤。
3）溶液Ⅰ：50 mmol/L 葡萄糖，25 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，10 mmol/L EDTA。
4）溶菌酶溶液：在溶液Ⅰ中将溶菌酶配成浓度为 40 mg/ml 的溶液。用前配制。
5）溶液Ⅱ：0.2 mol/L NaOH，1% SDS。用前配制。
6）溶液Ⅲ：5 mol/L 醋酸钾、pH 4.8，加冰醋酸至 3 mol/L 的醋酸钾中，直至达到所需要的 pH 值。
7）70%和 80%的乙醇。
8）TE：1 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，1 mmol/L EDTA。

2.2 柱上纯化 DNA

1）树脂缓冲液：7 mol/L 盐酸胍、pH 6.5。不用调节 pH 值，因为盐酸胍溶解后即为此值。

2）树脂糊母液：将 5 g 硅藻土与 50 ml 树脂缓冲液混合。作者使用的是购自 Sigma 公司的酸洗煅烧硅藻土（St. Louis，MO）（cat no. D－5384）（参见注释 1）。
3）合适的层析柱：层析柱安装在直径为 1.5 cm、体积为 50 ml 的圆锥形管上（参见注释 2 和 3）。从 Bio-Rad（Hercules，CA）购买的 Econo 柱用热的剃刀将顶部割去后可适用。
4）柱洗涤液：50% 乙醇，100 mmol/L NaCl，10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，5 mmol/L EDTA。

3. 方　　法

3.1　质粒 DNA 的制备

1）在新划线接种的平皿上挑取含有质粒的菌落（参见注释 4）接种于含有 500 ml 2×TY 培养基和抗生素的 4 L 三角烧瓶中，以 200 r/min 的转速在旋转式摇床上 37℃ 培养过夜。
2）倒入 500 ml 离心瓶中，以 5000 *g* 离心 10 min 沉淀细菌。将上清液倒出并将离心瓶倒置于纸巾上数分钟（参见注释 5）。
3）将沉淀重新悬浮在 18 ml 溶液 I 中。加入 2 ml 溶菌酶溶液并用移液管搅动混合，室温放置 10 min。
4）加入 40 ml 溶液Ⅱ，转动混匀后于冰上放置 5 min。
5）加入 20 ml 溶液Ⅲ，转动混匀后于冰上放置至少 15 min。这时有白色沉淀形成。
6）8000 *g* 离心 10 min，将上清液通过粗布滤入一干净的 250 ml 离心瓶中。
7）上清液中加入 45 ml 的异丙醇，混匀后 8000 *g* 离心 10 min。
8）小心地沥干管子并用 70% 乙醇洗涤沉淀。抽气吸去剩余的乙醇，置空气中干燥 10～20 min（参见注释 6）。
9）将沉淀溶解在 2 ml 的 TE 中，这步需要一些时间。作者在进行这一操作时是在沉淀中加入 TE 后放置大约 10 min，这样可使沉淀开始溶解，但作者仍用 1 ml 的吸嘴反复吸放以加速溶解。对于较小的质粒来说温和的涡旋振荡也有利于溶解。

3.2　层析柱纯化 DNA

1）将 3.1 节第 9 步的 DNA 溶液加入 15 ml 锥形管中。加入 10 ml 树脂糊母液，取用时要摇匀以保证树脂在溶液中。倒转数次使 DNA 与树脂混匀。
2）将树脂 DNA 糊状物倒入柱中，置于烧杯或是 50 ml 锥形管上方。
3）将柱连接到真空系统上（接在水泵上已足够）将缓冲液抽过柱（参见注释 7）。如有必要可以使用橡皮连接管保证与真空系统紧密连接。
4）用 13 ml 洗涤液淋洗原来盛放 DNA 和树脂糊的管子，洗后倒入层析柱。用真空系统将洗涤液抽过柱，重复一次。
5）用 5 ml 80% 乙醇洗涤，用真空泵抽吸过柱。柱继续留在真空系统上 10 min 使柱干

燥（参见注释 8）。

6) 从真空系统上取下柱，加入 1.5 ml 65～70℃ 预热的水或 TE，放置 1 min。

7) 将柱放在一个大的管子中，例如 50 ml 锥形管，在医用离心机或是角度转头中以 1300 *g* 离心 5 min，洗脱液收集在大管子的底部后转至 1.5 ml 的管子中贮存。

一个高拷贝质粒的典型的 DNA 收获量是在 2～5 mg 之间（参见注释 9）。这样得来的 DNA 可用于双链测序、亚克隆以及真核生物细胞的转染。

4. 注　　释

(1) Hengen 所推荐使用的其他类型的树脂有从闪烁管上破碎下来的燧石玻璃、Cellite™ 以及二氧化硅颗粒。Hengen 还建议用针筒与滤纸或是用微型离心管与硅化玻璃滤板制作层析柱。

(2) 在进行大量制备时非常重要的一点是要选用一根粗的柱，这样可以防止 DNA 溶液所引起的柱堵塞现象。

(3) 大量制备的试剂盒中的柱可以重复使用，但要经 NaOH 洗涤或是高压灭菌[3]。

(4) 尽管最好是使用平皿上新划种的单菌落接种，但也可以直接从甘油冻存的穿刺培养的菌种中挖出一小块进行接种。如果手头只有 DNA 就要先行转化然后用转化的细菌进行接种。最后一种方法可能冒着得到不均一质粒群体的危险。

(5) 沉淀的细菌可以在这一步于 −20℃ 冷冻贮存。

(6) 沉淀不需要绝对的干燥，小心地用滴管吸几次去除所有的乙醇可以节省干燥所需的时间。

(7) 除非 DNA 样品非常宝贵，没有必要保留洗涤液，因为在这步操作中大部分、甚至有多至 5 mg 的 DNA 可结合在树脂上。

(8) 另一个办法是放在一个较大的管子中，例如 50 ml 锥形管中，在医用离心机中以 2000 *g* 离心 10 min。

(9) 小量制备步骤详见 Carter 与 Milton[2]。

参 考 文 献

1. Boom, R., Sol, C. J. A., Salimans, M. M. M., Jansen, C. L., Wertheim van Dillen, P. M. E., and van der Noordaa, J. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28,** 495,496.
2. Carter, M. J. and Milton, I. D. (1993) An inexpensive and simple method for DNA purifications on silica particles. *Nucleic Acids Res.* **21,** 1044.
3. Hengen, P. N. (1994) Methods and reagents: on the magic of mini-preps. *TIBS* **19,** 182,183.

第五部分
PCR 技术

第三十四章　聚合酶链式反应：基本方法

Beverly C. Delidow, John P. Lynch, John J. Peluso, Bruce A. White

1. 引　　言

重复多轮的 DNA 合成技术与热稳定 DNA 聚合酶的发现共同为科学家提供了被称为聚合酶链式反应（PCR）的强有力的技术。PCR 是基于任何 DNA 合成所需的三个简单的步骤：①模板变性成单链；②引物与每一条原始链复性；为合成新链作准备；③新链从引物延伸。任何一种 DNA 聚合酶都可以完成这些反应而最终合成原始 DNA 序列的特定区域。不过，为进行一轮以上的合成，模板必须再次变性。由于变性温度都大大高于使大多数酶失活的温度，因此，最初尝试进行循环的 DNA 合成是通过每次变性后重新添加新的 DNA 聚合酶来实现的[1,2]。如此一种技术的高费用使它的应用很快受到限制。

来源于嗜热细菌 *Thermus aquaticus*（*Taq*）的热稳定的 DNA 聚合酶的发现和分离，使 Saiki 等[3]能重复合成新的 DNA 链，指数地扩增初始物质的指定区域，促成了一项一举成名的新技术的诞生。限制酶发现以来还没有一种新技术能使分子生物学发生如此巨大的革命。每月都有几十篇使用 PCR 方法的杂志论文发表，而且还有 PCR 的专刊（至少一种）。对那些每天应用和/或阅读有关 PCR 的人们而言，值得注意的是这一方法只有 10 年多一点的历史。

PCR 最大的优点之一是虽然对于实验室有一些要求，但所需设备相对而言价格低廉，占用很小的空间。PCR 的惟一特殊仪器是一台热循环仪。虽然没有热循环仪也可以从事实验，但用三台控温的水浴锅进行手工操作太繁琐且费时了。现在市场上已有不同种类的仪器可购置。一套专用移液器尽管有利，但并非必需。如果寡核苷酸引物是购得的，那么 PCR 所需的其他设备在任何一个从事分子生物学研究的实验室中都具备。因此，对大多数研究人员而言，PCR 是一种既非常有效又是经济上容易办到的方法。

关于 PCR 广泛的应用请参阅本丛书第 15 卷及几篇综述[4,5]。本章概述 DNA、RNA 模板的分离、PCR 的基本方法及几种分析 PCR 产物的通用方法。

2. 材　　料

2.1　DNA 和 RNA 模板的分离

2.1.1　DNA 的分离

1）用于抽提 DNA 的组织或细胞。
2）Dounce 匀浆器。

3）消化缓冲液：100 mmol/L NaCl，10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，25 mmol/L EDTA，0.5% SDS。

4）蛋白酶 K：20 mg/ml，－20℃保存。

5）a．经缓冲的酚：酚是强腐蚀性的，操作时须戴手套并穿防护衣。只能用玻璃移液管及玻璃或聚丙烯试管。酚可溶解聚苯乙烯塑料。

b．缓冲溶液：1 mol/L Tris 碱；10×TE、pH 8.0（100 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，10 mmol/L EDTA）；1×TE、pH 8.0（10 mmol/L Tris、pH 8.0，1 mmol/L EDTA）；在一瓶分子生物学级的重结晶酚内加等体积 1 mol/L Tris 碱。置瓶于60℃水浴中使酚液化（约 1 h），在通风橱中待其冷却。盖紧瓶盖，摇动以混匀各相（摇动时瓶子切勿向着自己），将瓶置于通风橱中通风。小心倒入或用玻璃移液管将酚移至带螺旋帽的 50 ml 离心管中。室温中以 4000 *g* 离心 5～10 min 以分相。抽气去除上层水相。再在下层（酚）中加入同等体积 10× TE（pH 8.0），盖紧离心管充分摇动混匀并再次离心。抽气去除水相。用等体积 1×TE（pH 8.0）再抽提酚 2～3 次至上层相 pH 值为 7～8（用 pH 试纸检测）。分装经缓冲的酚，加一层 1×TE（pH 8.0）于－20℃保存。

6）$CHCl_3$：氯仿。

7）70% 乙醇。

8）TE 缓冲液、pH 8.0：10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，1 mmol/L EDTA。

9）经磷酸盐缓冲的生理盐水（PBS）：20×母液（2.74 mol/L NaCl，53.6 mmol/L KCl，166 mmol/L Na_2HPO_4，29.4 mmol/L KH_2PO_4、pH 7.4）。用去离子蒸馏水配置，用 0.2 μm 滤膜过滤，室温保存。用时取 25 ml 母液加去离子蒸馏水稀释至 500 ml，加 250 μl 1 mol/L $MgCl_2$，过滤除菌，4℃保存。

10）7.5 mol/L 醋酸铵。

11）RNase A：在 10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，15 mmol/L NaCl 中制备 10 mg/ml RNase A。100℃ 中保温 15 min，冷却至室温，－20℃保存。

12）20% SDS（w/v）：去离子水配制。

2.1.2 RNA 的分离

2.1.2.1 氯化铯离心制备 RNA（见注释 1）

13）用于抽提 RNA 的组织或细胞。

14）2 ml 的 Wheaton 玻璃匀浆器。

15）异硫氰酸胍/β-巯基乙醇溶液(GITC/βME)：4.2 mol/L 异硫氰酸胍，0.025 mol/L 柠檬酸钠、pH 7.0，5% 十二烷基肌苷酸钠（Sarkosyl），0.1 mol/L β-巯基乙醇。除巯基乙醇外，其余成分用去离子蒸馏水配制成母液，用 Nalgene 0.2 μm 滤膜(Nalge Co.，Rochester，NY)（参见注释 2）过滤除菌后 50 ml 分装，－20℃保存。使用前冻融，取所需体积的溶液至一新管中，每毫升缓冲液中加 7 μl β-巯基乙醇。异硫氰酸胍和 β-巯基乙醇是强刺激物，小心使用。

16）1 ml 的结核菌素针筒，配以 21 号针头。

17）十分洁净的超速离心机离心管，11 mm×34 mm（Beckman＃347356）。

18）焦碳酸二乙酯（DEPC）：97%溶液，4 ℃保存。

19）DEPC 处理过的水[6,7]：在烤干的耐高压灭菌玻璃瓶中，装入 2/3 体积去离子蒸馏水。加 DEPC 至终浓度为 0.1%，加盖，振荡。松开瓶盖使瓶通风。于 37℃至少保温12 h（过夜方便些）。高压灭菌 15 min，使 DEPC 失活。室温保存。

20）200 mmol/L EDTA、pH 8.0：将分子生物学级 EDTA 二钠盐溶于去离子蒸馏水，0.2 μm 滤膜过滤除菌。置于带螺旋帽耐高压灭菌的瓶内，按处理 DEPC 水的方法进行处理后室温保存。

21）氯化铯（CsCl）：分子生物学级。如配 20 ml，取 20 g 固体氯化铯置 50 ml 灭菌管内。加 10 ml 经 DEPC 处理的 200 mmol/L EDTA（pH 8.0）。倒入 DEPC 水至体积 20 ml。经 0.2 μm 滤膜过滤，4℃保存。

22）TE 缓冲液、pH 7.4：10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.4，1 mmol/L EDTA。用 DEPC 水配制成 10 mmol/L Tris-HCl 和 1 mmol/L EDTA（pH 7.4）的溶液（参见注释3）。经0.2 μm滤膜过滤，高压灭菌 15 min 后室温保存。

23）TE-SDS：每次用时新鲜配置。以 DEPC 水制备 10% SDS 贮存液，于分装的 TE（pH 7.4）中加入 10% SDS，至终浓度为 0.2%。

24）4 mol/L NaCl：用去离子蒸馏水配制，并经 DEPC 处理，高压灭菌 15 min，室温保存。

25）Polyallomer 1.5 ml 微量离心管。用于超速离心机（Beckman＃357448，Beckman Instrument Inc.，Fullerton，CA）.

26）RNasin RNA 酶抑制剂，40 U/μl（Promega，Madison，WI），－20℃保存。

27）Beckman TL－100 台式超速离心机，TLS 55 转头和 TLA－45 转头。

2.1.2.2 用胍/酚（RNA_{ZOL}™）抽提法分离 RNA

28）RNA_{ZOL}试剂（TEL-TEST，Inc.，Friendswood，TX）：内含异硫氰酸胍，β-巯基乙醇及酚。须小心操作。

29）玻璃-聚四氟乙烯匀浆器。

30）一次性的聚丙烯沉淀杆及配套微型离心管（1.5 ml）（Kontes Life Science Products，Vineland，NJ）。

31）氯仿（ACS 级）。

32）异丙醇（ACS 级），－20℃保存。

33）80%乙醇：用经 DEPC 处理的水稀释 100%乙醇，－20℃保存。

2.1.3 从 RNA 合成互补 DNAs（cDNAs）

34）寡聚 $dT_{18\sim20}$引物（Pharmacia，Piscataway，NJ）：将 5 OD U 溶于 180 μl 灭菌DEPC 水中，终浓度为 1.6 μg/μl。

35）特异性引物，自选。选择序列并取得像进行 PCR 那样的引物。

36）Moloney 鼠白血病病毒逆转录酶（MMLV RT，200 U/μl），用制造商推荐的缓冲液及 0.1 mol/L DTT 配制。

37) dNTPs(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)。以 10 mg 固体状态供应。制备 10 mmol/L dNTP 母液：将 10 mg dNTP 悬浮于比配制 10 mmol/L 溶液少 10%的灭菌水中。用灭菌的 NaOH 及 pH 试纸调节溶液 pH 至近似于中性。根据供应商提供的每一 dNTP 的特定波长和摩尔消光系数，由 OD 值测定确切的浓度。例如：dATP 的 A_m (259nm)为 15.7×10^3，那么 1∶100 稀释的 10 mmol/L dATP 溶液的 A_{259} = (0.01 mol/L ×15.7×10^3 OD U/mol/L) ×1/100 = 1.57，假如 1∶100 稀释的 dATP 的实测 OD 值为 1.3，则 dATP 浓度 = 1.3/1.57×10 mmol/L = 8.3 mmol/L。以 50～100 μl分装的 dNTP 贮存液于 −20℃ 保存。配制在灭菌水中含每种 dNTP 125 μmol/L的日常工作贮存液作为 cDNA 合成或 PCR 之用。不用的工作贮存液可于 −20℃ 中保存 2 周。

2.2 PCR 操作（参见注释 4）

38) 寡核苷酸引物：互补于待扩增序列的 5′和 3′端，可在市场上购得。−20℃ 保存。
39) 经紫外线照射的灭菌水（参见注释 5)：过滤除菌后的去离子蒸馏水用 Stratagene (La Jolla, CA) Stratalinker UV 交联仪 (200 mJ/cm^2)[8]的上紫外线照射 2 min 或用 254 nm 和 300 nm 波长照射 5 min[9]，室温保存。
40) PCR 母液：供 PCR 专用。制备下列三种溶液，经过滤除菌后高压灭菌 15 min：1 mol/L Tris-HCl、pH 8.3，1 mol/L KCl，1 mol/L $MgCl_2$。
41) 10×PCR 缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl、pH 8.3；500 mmol/L KCl；15 mmol/L $MgCl_2$；0.01%（w/v）明胶。这种缓冲液可从 Perkin-Elmer/Cetus 公司购得。

    每 1 ml 10×PCR 缓冲液含：100 μl 1 mol/L Tris-HCl、pH 8.3，500 μl 1 mol/L KCl，15 μl 1 mol/L $MgCl_2$，375 μl 经紫外线照射的灭菌水。用经紫外线照射的灭菌水配制 1%明胶，60～70℃ 下加热，偶尔加以搅拌以使明胶溶解。趁溶液尚热时用 0.2 μm 滤膜过滤明胶液，每 1 ml 10×PCR 缓冲液中加 10 μl 1%明胶液。小份分装的 PCR 缓冲液（300～500 μl）在 −20℃ 下保存。格外小心起见，每次使用前可用紫外线照射 10×PCR 缓冲液。
42) 10 mmol/L dNTPs 贮存液（dATP，dCTP，dGTP，dTTP)：用经紫外线照射的水制备，见 2.1.4 节，第 5 项。
43) 1.25 mmol/L dNTPs 工作母液。每种 dNTP 浓度为 1.25 mmol/L，用经紫外线照射过的灭菌水配制。
44) 轻矿物油。
45) 7.5 mol/L 醋酸铵，经 0.2 μm 滤膜过滤除菌，室温保存。
46) *Taq* DNA 聚合酶。

2.3 用巢式 PCR 方法分析 PCR 产物[10]

47) 低熔点琼脂糖。
48) 琼脂糖凝胶电泳试剂（见 2.3.1.1，第 2～5 项)。

49）寡核苷酸引物，互补于待扩增 DNA 部分的内部序列（巢式引物，nested primer）。

2.4 通过直接标记的 PCR 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 PCR 产物

50）α ^{32}P-dCTP，3000 Ci/mmoL。
51）3 MM 滤纸
52）X 射线胶卷

3. 方　　法

3.1 DNA 和 RNA 模板的分离

3.1.1 DNA 的分离[7]

以下方法适用于从较大量的组织样品中分离用于 PCR 的 DNA，或从培养细胞中大量制备 DNA。

1）将组织块置于冰冷的 PBS 中，称重后用刀片切成小块。如果培养细胞则经离心收集，用冰冷的 PBS 洗一遍，加入与沉淀体积相等的 PBS 重悬细胞。
2）将组织或细胞放在 Dounce 匀浆器中，每克组织（或每毫升的压紧的细胞）中加入 12 ml 消化缓冲液。
3）置冰浴中，用 B 研棒轻轻研磨 20 次使成匀浆。
4）将样品移入试管，加蛋白酶 K 至终浓度 100 μg/ml，50℃ 培养过夜。
5）用等体积酚/氯仿（1∶1，体积比）抽提两次。
6）等体积氯仿抽提两次。
7）加 0.5 倍体积 7.5 mol/L 醋酸铵和 2 倍体积无水乙醇，轻轻混匀，应立即可见有纤维状的 DNA 沉淀。
8）4℃ 中以 12 000 *g* 离心 15 min 以收集 DNA。
9）用 75％乙醇洗涤沉淀，倾去上清液，空气中干燥。
10）将 DNA 重悬于 TE 缓冲液、pH 8.0（7～10 ml/g 组织），于 65℃ 中轻轻摇动培养样品有利于 DNA 重悬。
11）加 SDS 至终浓度 0.1％及 RNase A 至终浓度 1 μg/ml。37℃ 保温 1 h。
12）按步骤 5～10 用酚/氯仿重新抽提，沉淀，重悬 DNA。在 4℃ 的乙醇中可长期保存 DNA。

3.1.2 RNA 的分离

目前从细胞或组织提取 RNA 的方法有多种。以下介绍的两种方法我们常规用于从较少组织样品或培养细胞中分离 RNA。一是氯化铯离心法：使 RNA 通过氯化铯垫层的离心可更为彻底地去除 DNA。另一种从胍溶液中提取 RNA 的方法较为省时。

3.1.2.1 氯化铯离心法分离 RNA[11]

我们曾用此法从鼠的完整的卵巢（多达 6 个卵巢，约 150 mg 组织/样品），从卵巢粒层细胞及从 GH_3 垂体肿瘤细胞（来自 5×10^7 细胞核）中分离 RNA。与下面介绍的胍/酚抽提法相比，此法更为耗时，但我们发现用这种方法可从卵巢组织得到更纯的 RNA 制备物，尽管在卵巢组织中不仅含有 DNA，且有丰富的脂质沉积。此法也被推荐用于制备核 RNA，因为细胞核的 DNA 含量要比整个细胞或组织中含量高得多。

1）取数分钟内处死的动物组织，放入冰冷的 PBS 中，如有必要，剔除脂肪及/或筋膜。将组织切成（2～3 mm 见方的）小块。(参见注释 6)。
2）将组织放入 2 ml 的 Wheaton 玻璃匀浆器中，内含 1 ml GITC/βME 缓冲液。徒手匀浆直至无明显的块状物为止（参见注释 7 和 8)。
3）将样品移至 5 ml 或 15 ml Falcon 管中。用装有 21 号针头的 1 ml 结核针筒吸入匀浆，反复通过针头吸放以剪切 DNA，应避免形成泡沫，直至溶液不太黏稠而能一滴滴地滴出为止（参见注释 9)。
4）用 0.3 ml GITC/βME 缓冲液洗涤十分透明的 Beckman 离心管，倒置晾干，将干管放直，加入 875 μl 氯化铯溶液至每一管底。
5）每一组织样品中加 300 μl GITC/βME 缓冲液，混匀。将整个样品（1.3 ml）铺在氯化铯垫层顶部，注意不要扰乱交界层。
6）在每一管中加入样品或/和 GITC/βME 缓冲液直到离管口 2 mm 处。用 GITC/βME 缓冲液平衡离心管，偏差在 0.01 g 以内。
7）将离心管放入 TLS－55 转头（Beckman）的吊篮中，在 16℃ 中以 100 000 *g* 离心 3 h。这使 RNA 沉淀而 DNA 不沉淀（参见注释 10)。
8）从吊篮中取出离心管，快速倒转以倾空上清液，并即刻将管口向下放在管架上或放在干净的纸巾上约 15 min 以吸干管内液体。在管内液体未干前勿扶正离心管。
9）用干净卷筒纸伸入试管内壁以吸去残留液体。不要碰到管底。RNA 沉淀是看不到的。
10）加 400 μl TE-SDS 至管底，勿使 TE-SDS 顺管壁流下。盖上管盖，放入试管架，置于旋转平台上，室温中缓缓转动 20 min 以溶解 RNA。
11）用设置在 200 μl 刻度的微量移液管分两次将 RNA 溶液转移到 1.5 ml 微型离心管内（参见注释 11)。在吸取 RNA 溶液过程中，注意上下吹吸并用吸管尖端轻刮管底以确保 RNA 溶解。在这一过程中应避免 SDS 形成泡沫。
12）在1.5 ml 微型离心管的 RNA 样品中加200 μl 经缓冲的酚和200 μl 氯仿，充分混匀。
13）于台式离心机上以最高速离心 2 min 使分相。
14）转移上层水相至干净的微型离心管中，加 400 μl 氯仿，混匀，离心分相如步骤 13。
15）再把水相移至清洁管中，再次用氯仿抽提。
16）将最终澄清水层移至 Beckman 超速微型离心管中。加 25 μl 4 mol/L 氯化钠，混匀。加 1 ml 冷的 95% 乙醇，再混匀，于－20℃ 中沉淀过夜（参见注释 12)。
17）用 Beckman TLA－45 转头在 4℃ 中以 12 000 *g* 离心 30 min 以收集 RNA。
18）倾去上清液，将管口向下覆在干净的卷筒纸上，空气中干燥。此时管底可见半透明白色 RNA 沉淀。

19) 加 25～100 μl TE（pH 7.4）重悬 RNA，具体所用容积取决于沉淀的多寡。为了防止 RNA 降解，加 1 U/μl 核糖核酸酶抑制剂并轻轻混匀。

20) 在 3～5 μl RNA 溶液中加 0.4～1 ml 灭菌水，测定 OD_{260} 及 OD_{280}。OD_{260}/OD_{280} 值应接近 2.0。若 $OD_{260}/OD_{280}<1.7$ 则表示 RNA 中混有酚和蛋白质，应再次抽提和沉淀。RNA 浓度按以下公式计算：

$$[RNA]\ (\mu g/\mu l) = (OD_{260}\times 40) \times 总体积\ OD'd\ (ml)\ /\mu l\ RNA\ OD'd$$

21) 如 RNA 短期(几周)贮存，可将 RNA 的水溶液在 -20℃ 中保存。如以更为稳定的状态作较长期保存，则保存在乙醇中。加 NaCl(终浓度为0.25 mol/L)和2.5倍体积95％乙醇至 RNA 的水溶液中，混匀，-20℃ 保存。按步骤17离心可使 RNA 复原。

3.1.2.2 用 RNA_{ZOL} 法分离 RNA

用 RNA_{ZOL} 技术(TEL-TEST, Inc.)可快速分离得到非常纯的 RNA，这是基于 Chomczynski 和 Sacchi[12]的方法。从多份样品，尤其从小组织样品(＜500 mg)分离 RNA 时这一方法最为有用。以下方案是来自 TEL-TEST 公司，通常我们使用时略加修改。

1) 每 100 mg 匀浆组织加 2 ml RNA_{ZOL}[13]，用聚四氟乙烯（Teflon）玻璃匀浆器捣几次。如标本＜50 mg，应用 Kontes 聚丙烯棒直接在 1.5 ml Eppendorf 管内研磨匀浆。短暂的超声处理有利于捣碎任何残留组织块，但切勿使匀浆器发热（参见注释 9)。

2) 悬浮生长的细胞应在培养基中离心（最大 200 g，5 min）沉淀。倾去上清液，按 0.2 ml/10^6细胞加入 RNA_{ZOL}，反复抽吸，涡旋振荡，使细胞完全裂解。

3) 生长于培养皿上的细胞可在培养皿内裂解。去除培养基后在培养皿中加入 RNA_{ZOL}（如 1.5 ml/3.5 cm 培养皿）使覆盖细胞。用刮棒刮细胞或/和用移液管反复吹吸细胞，以确保细胞完全裂解。附着的细胞也可用刮棒刮拢收集在一起，然后按步骤 2 使细胞沉淀和裂解。

4) 每 1 ml 匀浆加 0.1 ml 氯仿。在涡旋振荡器上至少剧烈震荡 15 s，直至匀浆液完全变成白色泡沫状，置冰上 15 min。然后再像前次那样涡旋振荡后在 4℃ 中以 10 000 g离心 15 min。

5) 此时离心管内应可见两层液相。小心取出并保存上层含 RNA 的水相。这水相体积约为匀浆的体积的一半。吸取时不要触及交界面。将下层的有机相弃入废液缸中，用适当方法处置。

6) 水相内加入等体积冰冷的异丙醇，于 -20℃ 中放置45 min(参见注释13)使 RNA 沉淀。在4℃ 中以12 000 g 离心15 min（或在台式离心机上，在4℃ 中以10 000 g 离心 30 min)，以沉淀 RNA。这一步后常在管底可见(但并不总是可见)白色 RNA 沉淀。

7) 小心倒去上清液。用 80％乙醇（0.8 ml/100μg RNA）洗沉淀物。短暂涡旋使沉淀松开，然后在 4℃ 中以 12 000 g 离心 10 min。倾去上清液并重复乙醇清洗。RNA 沉淀往往与管壁粘附不太牢，故弃上清液时动作应轻。

8) 沉淀可空气干燥，直到略显潮湿（完全干燥的沉淀难以重悬）。每 100 μg RNA 中加 50 μl TE 缓冲液（pH 7.4），涡旋振荡或反复吹吸使沉淀重悬。室温放置15～30 min 有助于重悬难以悬浮的沉淀。如果其他方法都不见效，为了重悬也可在60℃ 中保温 10～15 min。我们用此法常能获得 OD_{260}/OD_{280}的值为2.0～2.1。如果比值＜1.7，须

按 3.1.2 步骤 1 重新抽提和沉淀。用此法分离的 RNA 在作酶处理前还应再沉淀。

3.1.3 从 RNA 合成互补的 DNAs

为了用 *Taq* DNA 聚合酶对 RNA 序列作 PCR，RNA 必须先反转录成互补 DNA (cDNA)，因 *Taq* 酶仅具有限的逆转录酶活性[14]（参见注释 14）。用于合成 cDNAs 的引物有几种，寡聚-dT 能在所有 poly$^+$A RNAs 上引发 cDNA 合成。这些 cDNAs 可用于多种 RNA 的扩增，所以为方便起见所常用。随机引发的 cDNA 合成也能产生各种各样的 cDNAs，不限于 poly A$^+$ RNAs。最后，与目标 RNA(s)互补的寡核苷酸引物可能被用来合成高度特异的 cDNAs。我们建立以下使用寡聚-dT 或 RNA 特异性引物的方法。关于用随机引物合成 cDNAs 的方法可参见参考文献[15]。

1）在装有 4 μg 寡聚-dT 或 200 pmol 的特异性引物和 5 μl 10×反转录缓冲液的微型离心管中加 20 μg RNA，总体积为 6.5 μl（参见注释 15），轻摇混匀。
2）65℃保温 3 min，置冰上冷却。
3）加 5 μl 100 mmol/L DTT，1 μl（40 U）RNasin 和 5 μl 脱氧核苷酸混合物，其中含每种核苷酸 1.25 mmol/L（每种核苷酸终浓度为 125 μmol/L）。加 2.5 μl（500 U）MMLV 逆转录酶，轻轻混匀。终体积为 50 μl。
4）37℃保温 1 h。
5）由此生成的 cDNA 可直接用于 PCR 反应，或被进一步修饰（参见注释 16)。

3.2 PCR 操 作

进行 PCR 的理想情况应是有专用实验室、专用试剂及设备。如此奢侈实属不易，但 PCR 试剂必须专用。一套专用移液器及带有滤膜的吸嘴对 PCR 十分有帮助，且目前已有多家厂家供应。当处理 PCR 试剂时，总应戴手套。务使靶序列浓缩母液（如重组质粒）远离 PCR 区域及 PCR 仪器。偶然性污染的追查和摆脱是极难的。

PCR 循环有三个基本步骤：

1）变性：使模板解链成单链，并消除二级结构。在常规周期中这一步于 94℃进行 1～2 min。然而，扩增基因组 DNA 时需较长的起始变性时间（约 5 min）以使其解链。
2）复性：使引物与模板“杂交”。此步的反应温度取决于引物解链温度及对扩增的特异性的要求。典型的反应通常采用 55℃的复性温度作用 1～2 min。如对扩增反应的特异性要求较高，则于 60～65℃中进行复性。引物特异性较低的反应可在 37～45℃中复性。
3）延伸：合成新的 DNA 链。这步通常于 72℃进行，这一温度是 *Taq* DNA 聚合酶的最适温度。扩增时间则取决于待扩增序列的长度。在最适条件下，*Taq* DNA 聚合酶的延伸率为 2～4 kb/min（制造商提供的资料)。通常，我们设置的扩增率为 1 kb/min，如扩增长度＞3 kb，所设置的扩增 1 kb 所需的时间要长些（参见注释 17)。

20～30 个 PCR 循环对于许多应用是足够了。当引物和 dNTPs 耗尽时及当模板分子数目超过聚合酶的供应时，DNA 的合成效率就会下降。因此，最后一次循环后于

72℃中最终延长 5～15 min 会使一些未完成的合成反应得以完成。在扩增程序结束以后，许多循环仪有一种便利的功能，可使样品无限期地保存于 15℃，尤其适用于通宵进行 PCR 实验。

在理想情况下，对每一种模板和相应的引物都应分别设置最优反应条件，但在实际工作中，大多数研究人员使用供应商推荐的条件，除非所得的结果偏离预测太远。除引物序列外，对于每一个扩增反应可能被优化的变量有 6 个：复性温度、引物浓度、模板浓度、$MgCl_2$ 浓度、延伸时间、循环数目（见参考文献[15]）。标准的条件叙述如下：

1) 配制 PCR 试剂的混合母液（每 100 μl 的 PCR 反应液）含 10 μl 10×扩增缓冲液，100 pmol 上游引物，100 pmol 下游引物，16 μl 1.25 mmol/L dNTP 工作母液（参见注释 18)。加入经紫外线照射的灭菌水，所加水的体积是使加了样品和 *Taq* 聚合酶后总反应体积为 100 μl。配制稍过量（额外增加 0.2～0.5 次反应所需量）的混合母液以保证足以提供所有的样品所需用的量。
2) 按所需量，将样品分装到有标记的 0.5 ml 微型离心管中。我们通常扩增由 10 μg RNA 制成的 50 μl cDNA 中的 5 μl（1/10)。基因组 DNA 通常被扩增的量为 100 ng～1 μg。用经紫外线照射的灭菌水调节体积使各管体积相等。
3) 于母液中每次反应加 0.5 μl *Taq* 聚合酶（2.5 U)，充分混匀，并在微型离心机中短暂离心以收集所有液体（参见注释 19)。
4) 每一样品管中加一定体积的混合母液，使总体积现在是 100 μl。加盖，涡旋振荡使管内液体混匀，再在微型离心机中短暂离心。
5) 打开管盖，于反应体系中加入数滴轻矿物油以防样品蒸发。
6) 在装样品的热循环仪的每一样品槽内加一滴轻矿物油。插入样品管（参见注释 20)。
7) 根据前面所述的原则扩增样品。
   a. 用于 1 kb 扩增区域的 cDNA 的典型循环程序是下列 30 个循环：94℃、2 min（变性)；55℃、2 min（引物的“杂交”)；和 72℃、1 min（引物延伸)；接着 72℃、5 min（最后延伸)；和 15℃中无限期地保存直到样品取出。
   b. 用于 2 kb 扩增区域的基因组 DNA 的典型循环程序是：94℃、5 min（起始变性)；接着的 30 循环是 94℃、2 min；60℃、2 min；和 72℃、2min；最后延伸 72℃、10 min；保存于 15℃。
8) PCR 反应结束后取出样品，每管中加入 200 μl 氯仿，矿物油将沉入管底。
9) 无须混匀，将样品置于台式离心机上以最高速离心 30 s。
10) 将上层相移入一干净的微型离心管中。加 50 μl 7.5 mol/L 醋酸铵，充分混匀（参见注释 21)。
11) 加 375 μl 95％乙醇，混匀。对于浓缩的样品在室温中静置 10 min，对于不甚浓缩的样品则置冰浴 30 min。
12) 在台式离心机上以最高速离心 15 min。
13) 倾滗去上清液（参见注释 22)，空气中晾干沉淀，用 20 μl 灭菌水重悬沉淀。

3.3 用巢式 PCR 分析 PCR 产物

琼脂糖凝胶和丙烯酰胺凝胶均可用于分析 PCR 产物，这取决于所要求的分辨率和是否须从凝胶回收 PCR 产物。微型琼脂糖凝胶电泳快速易行，且能很快地用以估计 PCR 产物的纯度和浓度（参见第三章）。琼脂糖凝胶比聚丙烯酰胺凝胶可以更快和更有效地回收 DNA（参见第二十八章）。琼脂糖凝胶电泳后用特异性探针作 Southern 印迹杂交，能在高度非专一扩增的背景中检测某一 PCR 产物[3]，这也是证明扩增片段相应于已知序列的一种方法[3,16]。最后，当 PCR 产物丰度不足以用溴化乙锭染色检测时，用 Southern 印迹都能检测出来[16]。

巢式引物能通过再度扩增 DNA 内侧区域来确定 PCR 产物。这一方法利用低熔点琼脂糖胶上的 DNA 带可被割下后直接用于 PCR 反应而不须进一步纯化的事实[17,18]。

1）在 0.7%～1% 低熔点琼脂糖（如 NuSieve，FMC BioProducts）凝胶电泳扩增产物。若于 4℃ 中缓慢地进行电泳（12～25V）则分辨率可能会提高。
2）用紫外线灯照射溴化乙锭染色的凝胶以确定所需条带的位置。割下条带，移入微型离心管中。
3）68℃ 保温 5～10 min，使凝胶条带熔化。
4）取 10 μl 直接加至另一含 PCR 混合液和巢式引物各 100 pmol 的管中，再次扩增。
5）按第三章的方法，通过琼脂糖凝胶电泳检查第二次 PCR 产物。

3.4 直接标记的 PCR 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳用于 PCR 产物的分析

聚丙烯酰胺凝胶电泳可提供较高的分辨率以及对扩增产物大小更为精确的估计（参见第十三章），这是检测直接标记的 PCR 产物的首选方法。变性聚丙烯酰胺凝胶中含有尿素，可用于分析例如来自不对称 PCR 的单链产物。

在 PCR 混合液中加入放射性元素标记的核苷酸来标记 DNA 片段，通过聚丙烯酰胺凝胶电泳及自显影，可高灵敏度和半定量地检测 PCR 产物。用密度扫描仪扫描，或将凝胶上切下的标记条带直接进行闪烁计数，可以对凝胶上的条带作定量分析。我们曾用直接标记的 PCR 产物的放射自显影法测定鼠卵巢基粒细胞[19]及垂体肿瘤细胞株[11]的数种 mRNA 的相对水平。

1）制胶和制样、电泳、染色、照相（参见第十三章）。记住，凝胶是放射性的，应小心操作。
2）切一片大于凝胶的 3 MM 滤纸。将凝胶拎起放在塑料纸上，再把塑料纸放在平坦的表面上。展平凝胶中的任何皱纹。
3）把滤纸盖在凝胶上面。当滤纸与凝胶粘在一起后滤纸应即刻开始浸湿。将凝胶、塑料纸及滤纸一起反过来，于是凝胶有了一层滤纸衬托。
4）凝胶在凝胶干燥机上干燥 30～45 min。为避免污染凝胶干燥机，在凝胶下可再垫一层滤纸。

5) 将干了的凝胶用新的塑料纸包好。放入装有 X 射线底片的暗盒内曝光 4 h 至 2 d。

4. 注　　释

(1) 为防止无所不在的 RNase 降解 RNA，在配置 RNA 分离试剂和分离 RNA 过程中必须注意以下问题：整个过程都要戴手套。尽可能用最高质量的分子生物学级别的试剂；所有的玻璃器皿都经烘烤。使用一次性灭菌的塑料制品。

(2) 因胍溶液能溶解 Corning 滤膜，故须用 Nalgene 滤膜过滤除菌[6]。

(3) DEPC 在 Tris 缓冲液中要分解，故不能用 DEPC 配置 Tris 缓冲液[6]。

(4) 在制备 PCR 试剂或操作 PCR 时，应戴手套，以防污染。

(5) 建议只要不含核苷酸或引物，所有用在 PCR 中的溶液均须经紫外线照射灭菌以减少母液偶受 PCR 目标序列的污染的机会，从而干扰样品的扩增[8,9]。

(6) 收集用作分离 RNA 的培养细胞时，将所需体积的细胞悬液直接倒入 50 ml 离心管中，贴壁细胞则用刮棒刮落，避免用酶取下贴壁细胞，因酶制品可能污染有核酸酶。于 4℃ 中以 250 *g* 离心 4 min。用原体积 1/10 的冷 PBS 重悬细胞，再离心。分离完整细胞的 RNA 按注释 10 进行。提取核 RNA 则将细胞在含 0.5% NP－40 的1 ml PBS中裂解，4℃ 中以 600 *g* 离心 5 min 收集细胞核，接着按注释 10 进行。

(7) 匀浆时应避免样品形成泡沫。

(8) 对于细胞或核沉淀，用手指轻弹微型离心管管壁以松动沉淀，加 1 ml GITC/βME 缓冲液，置冰浴几分钟使沉淀溶解。用处理组织块所用的方法剪切 DNA（参见 3.1.2.1 节，第 3 步）。

(9) 也可用超声波于1.5 ml 微型离心管中处理 DNA 以代替剪切。根据样品的黏滞度，我们用 Virsonic 50细胞粉碎仪（Virtis, Gardiner, NY），设定在产生最大脉冲的40%～50%的脉冲，根据样品的黏滞度作用10～30 s。使用超声波仪时，为减少泡沫须保证探头尖端处于样品底部。仅当浸没探头后才接通超声波仪，如超声波处理不止一次，则各次脉冲应间隔10 s 以使样品冷却。为防止 RNA 降解，探头在使用前要用灭菌水清洗，用后同样用灭菌水洗净胍溶液。同时应注意保护操作者的听觉。

(10) TLS－55 转头有 4 只吊篮，虽然只有两份样品也能用，但离心期间必须 4 个吊篮都就位。

(11) 样品不能置于极透明（ultraclear）管中抽提，因其不耐有机溶剂。

(12) 沉淀也可于－70℃ 中进行 1 h。

(13) 用异丙醇于－20℃ 中长时间沉淀 RNA 时，将使污染物与 RNA 同时沉淀。此时如必须暂停操作，可在这步将标本保存于 4℃。继续时，按步骤 4 将样品于－20℃ 中放置 45 min。

(14) 目前多种具有逆转录酶活性及 DNA 聚合酶活性的双重功能的耐热酶已有市售（TetZ, Amersham, Arlington Heights, IL；TTh；20）。不同的活性依赖不同的二价离子，因此改变缓冲液可调节不同的活性。

(15) 合成可扩增 PCR 的 cDNA 所需的 RNA 量的低限不能为常规方法所检出。我们曾用少至 0.4 μg 的可测量的 RNA 制备 cDNA，甚至用更稀的 RNA，稀到测量不出

OD 值为止[11,19]。也有人用 PCR 从单个细胞制备的 RNA/cDNA 样品中检测特异的 RNAs[21]。

(16) cDNA 的一些应用如加尾反应可能须合成双链 cDNA。RNase H 及 DNA 聚合酶可完成第二链的合成。达到这一目的的步骤可得自出售试剂盒的厂方和参阅参考文献[6,7]。同聚物加尾可用于锚定 DNA 序列，使扩增从已知区域开始一直到未知的加尾末端[18]。加尾反应的步骤亦可参阅参考文献[6,7]。此外，也曾报道用 RNA 连接酶在单链 cDNA 的 3′端加上接头（相当于 RNA 未知的 5′端）。这就使得在 cDNA 已知区域和接头间可进行后续的 PCR，且有助于确定 mRNA 的 5′端。在其他 PCR 应用中有必要除去用于制备 cDNA 的引物。这可能通过许多轮次的醋酸铵沉淀或通过从凝胶中纯化而达到。

(17) 虽然对于非常长的靶序列的扩增，PCR 的效率可能会减低。但我们已成功地扩增出长度大于 6 kb 的序列。

(18) 为了直接标记 PCR 产物，改变核苷酸混合液使它含：625 μmol/L dCTP，1.25 mmol/L dATP，1.25 mmol/L dGTP，1.25 mmol/L dTTP。并于上述混合物中每 100 μl 加入 5～10 μCi (0.5～1 μl) 的 α^{32}P-dCTP (3000 Ci/mmol) /100 μl。

(19) 对于在加 *Taq* DNA 聚合酶前先行变性（“热启动”)[22]的那些 PCR 程序，制备的反应液的体积应稍小并且不加 *Taq* 酶。样品置于循环仪中进行初步变性，接着保持于复性温度中 2 min。升温至 65℃时加入溶于少量 UV 灭菌水中的 *Taq* 酶，此步的时间设置应使所有样品中都能加入酶。这些样品接着于 72℃ 中延伸适当时间，然后和一般 PCR 一样进行热循环。

(20) 如果在样品的周围放些空管，可得较均匀的加热和冷却。

(21) 醋酸铵沉淀可去除引物及剩余的核苷酸[23]。

(22) 如果样品是放射性的，务必适当处理废物。

致　谢

我们感谢 Puja Agarwal 及 Anna Pappalardo 提供的优秀的技术帮助。此文由 NIH 基金赞助（项目 DK43064）。

参 考 文 献

1. Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230,** 1350–1354.
2. Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155,** 335–350.
3. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239,** 487–491.

4. Erlich, H. A., Gelfand, D., and Sninsky, J. J. (1991) Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* **252,** 1643–1651.
5. Robert, S. S. (1991) Amplification of nucleic acid sequences: the choices multiply. *J. NIH Res.* **3(2),** 81–94.
6. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
7. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Smith, J. A., Seidman, J. G., and Struhl, K. (eds.) (1987) *Current Protocols in Molecular Biology.* Wiley Interscience, New York.
8. Dycaico, M. and Mather, S. (1991) Reduce PCR false positives using the Stratalinker UV crosslinker. *Stratagene Strategies* **4(3),** 39,40.
9. Sarkar, G. and Sommer, S. S. (1990) Shedding light on PCR contamination. *Nature* **343,** 27.
10. Zintz, C. B. and Beebe, D. C. (1991) Rapid re-amplification of PCR products purified from low melting point agarose gels. *Biotechniques* **11,** 158–162.
11. Delidow, B. C., Peluso, J. J. and White, B. A. (1989) Quantitative measurement of mRNAs by polymerase chain reaction. *Gene Anal. Tech.* **6,** 120–124.
12. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162,** 156–159.
13. Chomczynski, P. (1991) Isolation of RNA by the RNAzol method. *TEL-Test, Inc., Bull.* **2,** 1–5.
14. Myers, T. W. and Gelfand, D. H. (1991) Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry* **30,** 7661–7666.
15. Zimmer, A. and Gruss, P. (1991) Use of polymerase chain reaction (PCR) to detect homologous recombination in transfected cell lines, in *Methods in Molecular Biology, vol. 7: Gene Transfer and Expression Protocols* (Murray, E. J., ed.) Humana, Clifton, NJ, pp. 411–418.
16. Ohara, O., Dorit, R. L., and Gilbert, W. (1989) One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86,** 5673–5677.
17. Belyavsky, A. (1989) Polymerase chain reaction in the presence of NuSieve™ GTG agarose. *FMC Resolutions* **5,** 1,2.
18. Belyavsky, A., Vinogradova, T., and Rajewsky, K. (1989) PCR-based cDNA library construction: general cDNA libraries at the level of a few cells. *Nucleic Acids Res.* **17,** 2919–2932.
19. Delidow, B. C., White, B. A., and Peluso, J. J. (1990) Gonadotropin induction of c-fos and c-myc expression and deoxyribonucleic acid synthesis in rat granulosa cells. *Endocrinology* **126,** 2302–2306.
20. Tse, W. T. and Forget, B. G. (1990) Reverse transcription and direct amplification of cellular RNA transcripts by Taq polymerase. *Gene* **88,** 293–296.
21. Rappolee, D. F. A., Mark, D., Banda, M. J., and Werb, Z. (1988) Wound macrophages express TGF-α and other growth factors in vivo: analysis by mRNA phenotyping. *Science* **241,** 708–712.
22. Rauno, G., Brash, D. E., and Kidd, K. K. (1991) PCR: the first few cycles. *Perkin-Elmer Cetus Amplifications* **7,** 1–4.
23. Crouse, J. and Amorese, D. (1987) Ethanol precipitation: ammonium acetate as an alternative to sodium acetate. *BRL Focus* **9,** 3–5.

第三十五章　反向聚合酶链式反应

Daniel L. Hartl, Howard Ochman

1. 引　　言

反向聚合酶链式反应（IPCR）是常规聚合酶链式反应的最早的扩展，它可以用来扩增未知的寡核苷酸序列而无须求助于常规的克隆。在常规聚合酶链式反应中，用与已知序列末端互补的合成寡核苷酸引物扩增该序列[1,2]。两条引物的3′端彼此面对，一条引物的延伸产生为另一条引物复性的模板。周而复始的引物复性、聚合及模板变性导致靶序列的拷贝作指数式增长。但是，位于已知序列界线外侧的区域并不能用常规PCR进行直接扩增。因为指向外侧区域合成的DNA链与从另一方向合成的DNA链并不互补，外侧序列的拷贝至多以线性速率增加而已。

然而能选择性地扩增外侧序列的方法是很多的。这些应用中包括转座因子在基因组的插入位点的测定，在这里转座因子序列可用于选择寡核苷酸引物，也可以用以测定cDNA编码序列两侧的基因组DNA上下游区域，这里cDNA 5′及3′端序列可用于选择引物。另外一些应用包括测定克隆的DNA片段末端的核苷酸序列，尤其当这些DNA片段是像克隆于人工酵母染色体上[3,4]或者噬菌体P1上[5,6]的大片段DNA；在这些应用中引物序列的选择根据克隆位点两侧的载体序列。

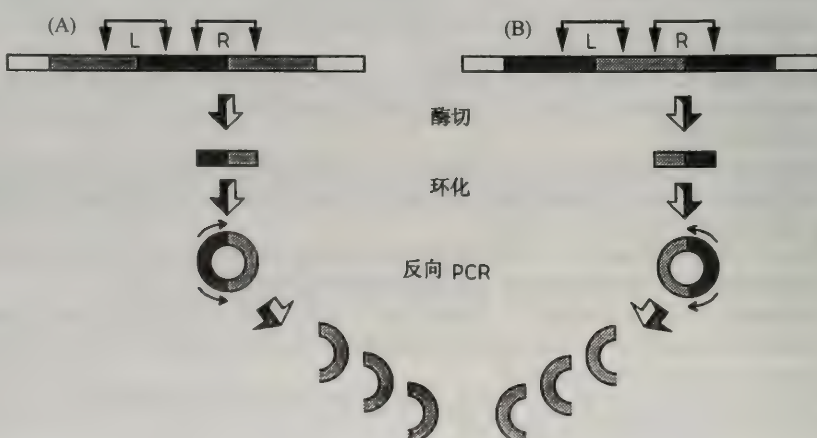


图35.1　反向PCR的主要应用。图中深色阴影区代表已知序列，浅色阴影区代表未知序列。(A) 已知序列位于未知序列之间，(B) 未知序列位于已知序列之间。带箭头的括号表示限制酶切位点的可能位置。它们使左侧（L）的或右侧（R）的序列得以通过IPCR而扩增。用适当的限制酶消化后分子环化，使已知序列中的两个位置与未知序列相邻近，于是已知序列便作为寡核苷酸引物位置（弯箭头）而扩增未知序列。

扩增两侧序列的可能性很是诱人，使好几个研究组接受了这一挑战，三个实验室几乎同时独立地建立了成功的方法[7,9]，而且三种方法的思路相同，正如图 35.1 所勾画。方法（A）及（B）代表两类主要的应用。深色阴影区代表已知序列区域，浅色阴影区代表未知序列区域。在方法（A）中已知序列（例如编码区）是连贯的，问题是要扩增基因组 DNA 左（L）或右边（R）的两侧序列。在方法（B）中已知序列（例如在克隆载体中）是间断的，问题是要扩增在左（L）或右边（R）带有未知序列的连接区。为便于进一步讨论，我们把已知序列、未知序列分别称为“核心”序列及“靶”序列。

这种方法的第一步是确定两种限制性内切酶，它们分别在核心序列和靶序列内切割，使切下的 DNA 片段中包含核心序列以及相邻的靶序列。限制酶的切割位点在图 35.1 中用箭头表示，通常每一连接区需要不同的酶。对于每一连接区，通过选择能在核心序列内距离连接区 50～1000 bp 位置上切割的酶，组成一批候选的内切酶。在候选者中一方面可以根据尝试法，或者更可靠地用核心序列作为探针通过 Southern 印迹[10]最后选定所要用的限制酶。带有四个碱基切割位点的限制酶通常更为可取，因它切割靶序列的位点常常更能令人接受。

切割后的下一步是环化，环化时限制酶所释放的片段的末端相互连接。这样产生的环化分子有两个核心-靶连接区，一个存在于原先的分子中，第二个由连接产生。连接后接着用靠近核心-靶连接区的核心序列设计寡核苷酸引物进行 PCR。IPCR 的“反向”一词来源于这样一个事实，即引物的 3′端向外指向靶序列（如图中弯箭头所示）。由于底物的环状构型，每一聚合形成的产物可以作为相对引物的复性模板。因此，周而复始的复性、聚合和模板变性可以使靶序列的拷贝以指数方式增长。

在病毒和转座因子插入片段基因组的两侧序列的回收方面[7~9]，在产生互补于克隆的插入片段末端的探针以用于染色体步移方面[11~14]，以及在直接克隆源于总 RNA 的未知 cDNA 序列方面[15]，IPCR 都被证明是非常有用的。从 IPCR 诞生起已经发展了许多方法，或是作为 IPCR 的替代，或者更合适用于某些特殊的用途。例如，用于人类基因组 DNA 的一项技术中应用载体序列设计一条引物，用 Alu 共同序列作为另一条引物，用以扩增 YAC 或黏粒克隆的插入片段的末端[16]。与这些技术最相关的技术在注释中将作简要讨论（参见注释）。

2. 材　　料

2.1　限制酶切片段的制备

1）限制酶和缓冲液：它们常常一起出售。进行消化时按制造商推荐的方法操作。不同的酶遵循不同的操作。
2）$T_{0.1}E$：10 mmol/L Tris-HCl，0.1 mmol/L EDTA、pH 8.0。

2.2　连 接 成 环

3）10×连接缓冲液：500 mmol/L Tris-HCl、pH 7.4，100 mmol/L $MgCl_2$，100 mmol/L

DTT，10 mmol/L ATP。

4）T4 DNA 连接酶：厂家供应的浓度为 1000 Weiss U/μl。

5）TE：10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，1 mmol/L EDTA。

2.3 PCR 扩 增

6）10 × PCR 缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl、pH 8.4，500 mmol/L KCl，5 mmol/L $MgCl_2$，0.1%明胶。

7）dNTP 混合物：将等摩尔的每种脱氧核苷三磷酸（dNTP），混合成 100 mmol/L 母液（每种 dNTP 浓度各为 25 mmol/L）。

8）*Taq* 聚合酶：厂家供应的浓度为 5 U/μl（参见注释 1）。

9）引物：引物长度因不同的应用而不同，但平均含 20 个核苷酸（参见注释 2）。稀释母液至 50 pmol/μl。

3 方 法

3.1 限制酶切片段的制备

这一步中最大的可变因素是 DNA 的质量及复杂程度。能获得最佳结果的 DNA 往往经酚抽提而得并来源于简单的基因组，例如细菌、酵母、线虫、果蝇（参见注释 3～7）。

1）根据制造商提供的条件，于 37℃ 中用限制酶消化 2 h。通常在初次消化中用 1～5 μg 基因组 DNA，在 20～50 μl 体积中进行。由于 DNA 样品在连接前须要沉淀，所以反应体积不是关键的。

2）用等体积经平衡的酚抽提。上下倒转样品，在微型离心机上短暂离心使分相，移出水相（参见注释 8）。

3）用氯仿/异戊醇（24∶1）抽提前一次抽提物的水相，方法同步骤 2。

4）乙醇沉淀：加 0.1 倍体积 3 mol/L 醋酸钠（pH 5.3），接着加 2 倍体积无水乙醇，置于 −20℃ 中 30 min 以沉淀 DNA，然后在 4℃ 离心 20 min 以收集 DNA。用 70%乙醇淋洗 DNA 沉淀，真空干燥。

5）样品重悬于 $T_{0.1}E$，浓度为 100 ng/μl。

3.2 连 接 成 环

为了选择某一比较有利于形成单体环的稀释度，建议以不同浓度的 DNA（20、100、500 μg/μl）同时进行反应。

1）设置三管，每管内分别含有 0.2 μl、1.0 μl、5.0 μl 的消化产物。

2）加入 10 μl 10 × 连接缓冲液和水至终体积 95 μl（蒸馏水分别为 93.8 μl、93 μl 及 89 μl）。

3) 加入 0.05 Weiss U/μl 的 T4 DNA 连接酶。于 14℃ 保温至少 2 h（连接反应通常进行过夜）。
4) 65℃ 加热 15 min 灭活，连接混合物按前节所描述的方法用酚/氯仿抽提，沉淀 DNA，并于 10 μl TE 中重悬 DNA。

3.3 PCR 扩 增

1) 对于每一连接产物，在适于 PCR 反应的管内加 4μl 来源于连接反应的 DNA。（参见注释 9），加 5 μl 10×PCR 缓冲液，0.4 μl dNTP 混合物，每种引物 1μl 和水至终体积为 50 μl。在反应混合物上覆盖矿物油 50 μl。
2) 反应混合物于 95℃ 中加热 10 min 使环化 DNA 模板上产生切口以利于扩增的进行。加 0.2 μl *Taq* 聚合酶。
3) 标准的扩增条件是 30 个循环，其中包括 95℃ 中变性 40 s，56℃ 中引物复性 30 s，72℃ 中引物延伸 100 s（参见注释 10）。
4) 取每一样品的 1/10 于 1% 琼脂糖凝胶上电泳以分析扩增产物。IPCR 产物可以用 Southern 印迹或者用来源于核心序列的探针进行杂交以求证实（参见注释 11）。一经证实，PCR 产物便可用于克隆（参见第二十七、三十七章）或直接测序（参见第四十九章）。

3.4 IPCR 产物的再次扩增

如果有非特异性产物被扩增出来，那么进行第二次扩增有时会有帮助。两种不同的方法可以采用。

3.4.1 巢 式 引 物

在这里，初始引物之一为另一引物所替代，后者用能与靠近核心-靶连接区但仍位于扩增片段内部的核心序列复性。
1) 取 1 μl 初次 PCR 产物作为扩增模板。
2) 用另一对引物取代初始引物重复初次 PCR，但是循环数减少到 15 次。

3.4.2 凝 胶 纯 化

另一种方法是将初次 PCR 反应产物先在琼脂糖凝胶上进行分离。
1) 取 5 μl 初次 PCR 产物于低熔点琼脂糖凝胶上电泳。
2) 用滴管的尖端吸取大小合适的片段进行抽提。吸取的凝胶栓应为 5～10 μl。
3) 将凝胶栓加入 100 μl 蒸馏水中，于 95℃ 中加热 5 min 以熔化琼脂糖。
4) 取 1 μl 用两条初始引物或巢式引物重复 PCR。用巢式引物的扩增方法参见 3.4.1. 节。

4. 注　释

(1) 在扩增来源于肠道细菌的片段时，我们用从嗜热细菌中纯化的 *Taq* 聚合酶；克隆的热稳定聚合酶（AmpliTaq）用于其他工作中。

(2) PCR 扩增的特异性很大程度上取决于对寡核苷酸引物的选择。我们典型地选用由 20 个核苷酸组成的引物，其中 G+C 含量为 50% 左右，理论上的平均复性温度为 60℃。复性温度按下法计算：$T_d \approx 2 \times (A+T) + 4 \times (G+C)$。

(3) 限制酶的选择由靶序列中的限制酶切位点的分布情况决定，必要时可通过 Southern 印迹确立[10]以及由 PCR 反应所能扩增的最长片段的大小确定。片段所含的靶序列以<3 kb 为较好，因为这样能达到最好的扩增效果。应用合适的限制酶有时只须进行一次酶切就可获得大小合适的、含有左侧或右侧核心-靶连接区（见图 35.1 的 L 和 R）的片段。

(4) 为了获得大小合适的核心-靶片段，有时须同时使用两种限制酶来消化；如果限制酶产生不匹配末端，就须在连接反应之前用 Klenow 酶或 T4 DNA 聚合酶将其末端补平。

(5) 在 IPCR 的特殊用途中，我们曾成功地用 *Pst* Ⅰ回收大肠杆菌的插入片段 IS1 的侧翼序列[7]，并用 *Cla* Ⅰ或 *Taq* Ⅰ回收插入片段 IS30 的侧翼序列[17]。用 *Eco*RⅤ可以回收最常用的 YAC 克隆载体内紧邻着丝粒的插入连接区，用 *Hinc* Ⅱ可以回收紧邻端粒的插入连接区[12]。

(6) 当核心序列内具有方便的 4 个碱基的限制酶切割位点时，大多数实验室通常的经验是在不预先进行 Southern 印迹[10]的情况下 IPCR 约有一半的成功可能性。这一成功率可能是由于这样一个事实：4 个碱基的限制酶切位点是非常常见的（从理论上讲，约 256 对碱基中即可能存在一个由 4 个碱基组成的酶切位点），因而靶序列上亦可能存在一个这样的酶切位点，且与核心片段的距离不远亦不近，正好合适。如果第一次实验失败，那么后续的试验须要根据 Southern 印迹的初步资料来选出合适的限制酶（或一对酶）。

(7) 须再次强调的是，IPCR 的成功取决于起始样品的复杂程度，基因组越简单结果越可靠。这一方法在处理克隆的 DNA 及大肠杆菌、线虫、果蝇这些分析对象时表现良好。复杂的基因组会增加非特异性 PCR 产物，并降低环化反应效率。通过富集合适大小的 DNA 片段，可以促进从较为复杂的基因组中回收侧翼序列。例如可用玻璃粉、电洗脱或者 DEAE 膜从琼脂糖凝胶上回收所需大小的限制酶切片段（由初步的 Southern 印迹确定）。为了用几种浓度的 DNA 进行环化及 PCR，大约需总量为 1 μg 的酶切 DNA。

(8) 将酶消化的样品热处理（于 68℃、10 min）以灭活限制酶，样品可以稀释并进行连接反应而不需要中间的纯化步骤（步骤 2～5）。

(9) 一些报道认为当用线状分子而不是用环状分子时 IPCR 的效率可以得到改善[9]。此时，可于核心序列的单一酶切位点进行酶切使环状片段线性化。不过为寻找合适的限制酶一方面增加了工作量，另一方面可带来潜在的复杂因素。

(10) 如果扩增产物预期长于 3 kb，则变性时间应相应地增加到 60 s，延伸时间增加到 150 s。

(11) 不宜使用 PCR 引物作为探针，因为这种探针能与由它们延伸的所有 PCR 产物杂交。

(12) IPCR 相关技术：在 IPCR 相关技术中，可以考虑从基因组 DNA 回收侧翼序列的有如下几种。详细的实验方法可参见原始文献，Ochman 等发表的论文中尚有关于这些方法的总体讨论[17]。

a. 由连接所介导的 PCR 中应用双链区段，其中包括一个 24-mer 和一个与 24-mer 的 3′端互补的 11-mer 寡核苷酸链，该区段的平末端连接在由复性到核心序列的寡核苷酸作为引物延伸得来的 DNA 片段上。实验细节可在文献 18～20 中找到。

b. 小载体（或称“气泡”）PCR 曾被用来回收 YACs 中的载体插入片段连接区[21]。用酶切位点处于核心序列中方便位置的限制酶处理从含有 YAC 的酵母细胞得来的 DNA。把一个包含非互补碱基的“气泡”区的双链寡核苷酸区段（小载体）连接到靶序列的末端。从专一于 YAC 载体的引物开始，利用一个复性于新合成链区域的寡核苷酸作为引物进行反方向的聚合，通过扩增合成一条新的、与“气泡”中一个不配对的环相互补的链。

c. 由寡聚区段介导的 PCR 中用一个连接在经合适的限制酶切割后的靶序列上的双链 28-mer[22]。通过与核心序列互补的生物素标记的引物延伸，经过大约 50 个循环的扩增取得生物素标记的扩增产物，使它和链霉素抗生物素蛋白所包被的玻璃珠相结合。这样分离得来的产物再用一个处于核心序列中的巢式引物和一个反向引物作常规 PCR。

致　谢

这一工作得到 D. L. Hartl 所获得的 NIH 资助项目 GM40322 和 HG00357 以及 H. Ochman 所获得的 NIH 资助项目 GM40995 的支持。

参 考 文 献

1. Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., et al. (1985) Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230,** 1350–1354.
2. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R. G., Horn, G. T., et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239,** 487–491.
3. Burke, D. T., Carle, G. F., and Olson, M. V. (1987) Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science* **236,** 806–812.
4. Hieter, P., Connelly, C., Shero, J., McCormick, M. K., Antonarakis, S., Pavav, W., et al. (1990) Yeast artificial chromosomes: promises kept and pending, in *Genetic and Physical Mapping,* vol. 1 (Davies, K. E. and Tilghman, S. M., eds.), Cold

Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 83–120.
5. Sternberg, N. (1990) Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87,** 103–107.
6. Pierce, J. C. and Sternberg, N. L. (1993) Using the bacteriophage P1 system to clone high molecular weight (HMW) genomic DNA. *Meth. Enzymol.* (in press).
7. Ochman, H., Gerber, A. S., and Hartl, D. L. (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics* **120,** 621–623.
8. Triglia, T., Peterson, M. G., and Kemp, D. J. (1988) A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res.* **16,** 8186.
9. Silver, J. and Keerikatte, V. (1989) Novel use of polymerase chain reaction to amplify cellular DNA adjacent to an integrated provirus. *J. Virol.* **63,** 1924–1928.
10. Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98,** 503–517.
11. Garza, D., Ajioka, J. W., Carulli, J. P., Jones, R. W., Johnson, D. H., and Hartl, D. L. (1989) Physical mapping of complex genomes. *Nature* **340,** 577,578.
12. Ochman, H., Medhora, M. M., Garza, D., and Hartl, D. L. (1990) Amplification of flanking sequences by IPCR, in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., and White, T., eds.), Academic, New York, pp. 219–227.
13. Silverman, G. A., Ye, R. D., Pollack, K. M., Sadler, J. E., and Korsmeyer, S. J. (1989) Use of yeast artificial chromosome clones for mapping and walking within human chromosome segment 18q21.3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86,** 7485–7489.
14. Silverman, G. A., Jockel, J. I., Domer, P. H., Mohr, R. M., Taillon-Miller, P., and Korsmeyer, S. J. (1991) Yeast artificial chromosome cloning of a two-megabase-size contig within chromosomal band 18q21 establishes physical linkage between BCL2 and plasminogen activator inhibitor type-2. *Genomics* **9,** 219–228.
15. Huang, S., Hu, Y., Wu, C., and Holcenberg, J. (1990) A simple method for direct cloning cDNA sequence that flanks a region of known sequence from total RAN by applying the inverse polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **18,** 1922.
16. Breukel, C., Wijnen, J., Tops, C., Klift, H. V., Dauwerse, H., and Meera Khan, P. (1990) Vector-Alu PCR: a rapid step in mapping cosmids and YACs. *Nucleic Acids Res.* **18,** 3097.
17. Ochman, H., Ayala, F. J., and Hartl, D. L. (1993) Use of the polymerase chain reaction to amplify segments outside the boundaries of known sequences. *Meth. Enzymol.* **218,** 309–321.
18. Pfeifer, G. P., Steigerwald, S. D., Mueller, P. R., Wold, B., and Riggs, A. D. (1989) Genomic sequencing and methylation analysis by ligation mediated PCR. *Science* **246,** 810–813.
19. Mueller, P. R. and Wold, B. (1989) In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science* **246,** 780–786.
20. Fors, L., Saavedra, R. A., and Hood, L. (1990) Cloning of the shark Po promoter using a genomic walking technique based on the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **18,** 2793–2799.
21. Riley, J., Butler, R., Ogilvie, D., Finniear, R., Jenner, D., Powell, S., et al. (1990) A novel, rapid method for the isolation of terminal sequences from yeast artificial chromosome (YAC) clones. *Nucleic Acids Res.* **18,** 2887–2890.
22. Rosenthal, A. and Jones, D. S. C. (1990) Genomic walking and sequencing by oligo-cassette mediated polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **18,** 3095,3096.

第三十六章　应用以简并寡核苷酸为引物的 PCR 技术克隆基因家族成员

Gregory M. Preston

1. 引　　言

1.1　什么是基因家族

随着越来越多的基因被克隆和测序，显然可见几乎所有的基因之间都彼此相关。相类似的基因组成基因家族。例如胶原基因家族、珠蛋白基因家族、肌球蛋白家族。还有基因超级家族，它们由高度同源和高度不同源的区域组成。例如癌基因超级家族、同源异形基因超级家族以及近来发现的与晶体纤维细胞主要内源蛋白有关的跨膜蛋白超级家族和 MIP 基因超级家族[1]。在多数例子中，基因家族内不同的成员行使相关的功能。

1.2　密码子选择

在特定的生物中，某些氨基酸密码子具有“优势”，与其他密码子相比，被使用的频率较高[2]。例如，参与组成丙氨酸的密码子有四种，都以 GC 开始，这一密码子的第 3 位置上的碱基 G 在人类（~10.3%）及鼠（~8.0%）中较少出现，而在大肠杆菌中较为多见（~35%）。这些密码子选择的特点对设计简并寡核苷酸引物甚为有用。

1.3　用 PCR 克隆基因家族成员的优点

与常规的克隆方法相比，用 PCR 法鉴别基因家族成员有许多优点。

① 在 PCR 克隆中可以用一条或一对简并引物。由于保守基因的序列倾向于它们的末端有所不同，因此两条简并引物法通常只能提供某一基因的一个内部片段序列。锚式 PCR 只使用一条简并引物，可用于获得延伸到 5′或 3′端的序列。对于锚式 PCR，第二条引物的位点必须由连接反应介导，使其序列或是进入克隆载体内（图 36.1，第 2 步）或是进入合成的接头序列内（如 RACE-PCR 中的 polyG 尾）。可是这一方法可能导致非特异性扩增物高本底，由于第二条引物存在于所有作为原始材料的基因中，当所处理的原始材料中的基因为数较少时，这更成问题。通过运用巢式扩增方法对目的序列进行优先扩增，这种缺点常常可以部分获得解决。在巢式 PCR 中，用第二条引物对初次 PCR 扩增产物再次扩增，这里第二条引物与初次引物的内部序列复性。

② 对从少量 mRNA 反转录得来的 cDNA 第一链实施 PCR 反应是可能的，而且从理

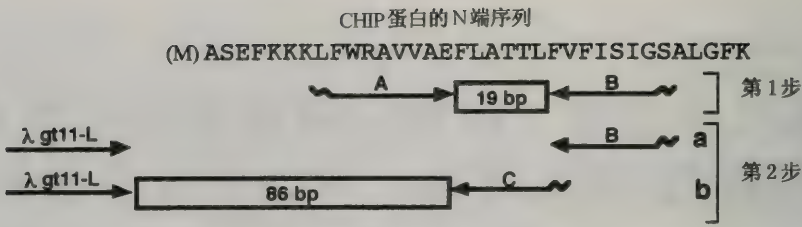


图 36.1 CHIP28 基因的 5′端序列的两步法克隆方案。顶端所列为 CHIP28 蛋白的 N 端氨基酸序列[8]，这里增加了一个从 pPCR-2 的 5′-克隆推导得来的甲硫氨酸（M）。直线代表寡核苷酸引物，箭头指向 3′端，～表示 5′端延伸部分，内含限制酶识别序列。步骤 1，测定在一对简并引物 A 和 B 之间的 19 bp 序列，并用以设计非简并引物 C。步骤 2，用引物 B、C 与 λgt11-L 进行筑巢式 PCR。所得到的 110 bp 扩增产物包括与氨基端 22 个氨基酸对应的序列、起始密码子甲硫氨酸及 5′端的 38 bp 的不翻译序列。

论上讲，甚至是来源于单个细胞的 mRNA。几个来源于不同激素作用下或不同分化阶段中的多种组织或培养细胞的单链“微型文库”可被快速制备并进行 PCR 分析。因此，某些罕见基因家族成员或 mRNA 剪切变异体的定时表达，都可通过 PCR 克隆的研究获得，而这些资料在重组文库中难以取得。

③ 与常规的方法相比，PCR 克隆更快速而廉价，在某些情况下，还可能是惟一可行的办法。从 λgt10文库筛选300 000个噬菌斑通常要花至少4天时间，而用 PCR 对一个含有10^8个独立的重组体的完整文库（～5.4 ng DNA）进行筛选，只须要进行一次反应。

不过，PCR 克隆时因经常会引入突变型，因此在用 PCR 法获得一个克隆后，建议从文库中分离出对应的克隆。或者对独立的两个或多个 PCR 克隆进行测序，亦可达到这一目的。

1.4 简并寡核苷酸理论

由于遗传密码是简并的，针对特定氨基酸序列的引物也应该是简并的才有可能编码出所有可能的排列。这样，针对有 64 种变化的某一段六个氨基酸序列的一个引物应能潜在性地识别 64 种不同的寡核苷酸序列，其中只有一种序列存在于靶基因中。如果在 PCR 反应中使用一对这样的引物，可能的排列数达到 $64 \times 64 = 4096$。由于 PCR 以指数级方式扩增产物，通过使用高度简并的引物可望克服这样一种困难，即只有一小部分引物能识别靶基因。另一个问题是其余的4095种可能排列可能识别其他基因产物，从而产生非特异性产物的本底。这种情况也可通过选用另一对引物或用“猜测多聚体”作为引物，对初级扩增产物进行第二轮巢式 PCR 扩增而得以避免。猜测多聚体是根据多个物种和组织中某些最常用的密码子设计的，所以其中并不包含氨基酸序列所有的可能排列。

1.5 总体策略

作者采用的这一基因克隆策略中，先用两条简并引物从 cDNA 文库模板克隆一段靶基因序列。并以此序列设计指向 cDNA 的 5′端及 3′端的特异性引物。这些新的引物与能和文库载体内部序列复性的引物联合使用，用来进行 PCR 扩增靶基因中缺失的末端序列。在这两种情况中，为增加产物的量，用原引物或巢式引物进行第二轮扩增。如图 36.1 所示 CHIP28 基因的克隆就是这一策略的例子。

2. 材　　料

1）模板：热变性的 cDNA 文库。在 PCR 扩增前 DNA 于 99℃ 中热变性 10 min。作者发现取自噬菌体粗裂解物或从噬菌体衣壳中分离的 DNA 作为模板无明显差异。
2）双蒸水经 0.2 μ 硝酸纤维滤膜（Millipore，Bedford，MA）过滤，高压灭菌后保存。
3）简并寡核苷酸引物：20 pmol/μl，溶于双蒸水。所选择的引物与氨基酸序列对应（见 3.1. 节）。

表 36.1　简并核苷酸表

字　母	表　示
A	Adenosine
G	Guanosine
R	puRine（A or G）
K	Keto（G or T）
S	Strong（G or C）
B	Not A（G，C or T）
H	Not G（A，C or T）
N	aNy（A，G，C or T）
C	Cytidine
T	Thymidine
Y	pYrimidine（C or T）
M	aMino（A or C）
W	Weak（A or T）
D	Not C（A，G，or T）
V	Not T（A，C or G）
I	Inosine[a]

a 尽管 Inosine 不是真正意义上的核苷酸，由于很多研究者已应用含有它的寡核苷酸引物来克隆基因家族成员，因而把它列在简并寡核苷酸表中。

4）10× PCR 反应缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl、pH 8.3（25℃ 时），500 mmol/L KCl，15 mmol/L $MgCl_2$，0.1%（w/v）明胶。于 50℃ 中保温以溶解明胶，过滤除菌。于 −20℃ 保存。
5）dNTP 贮存液：dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 1.25 mmol/L 的溶液。
6）热稳定 DNA 聚合酶：作者用 AmpliTaq DNA 聚合酶（Perkin Elmer Cetus，Nor-

walk，CT)，以 5 U/ml 溶液供应。

7）矿物油。

8）氯仿。

9）7.5 mol/L 醋酸铵：溶解于双蒸水中，0.2 μ 滤膜过滤。醋酸铵比醋酸钠好，因引物和核苷酸于醋酸铵中不易沉淀。

10）100％乙醇：－20℃保存。

11）70％乙醇：室温保存。

12）离心透析柱：用于纯化 PCR 产物非常理想。许多厂家都有供应（如 Millipore 及 Centricon)。作者更喜欢用 Millipore Ultrafree MC 微量滤过器（30 000 mol wt cut-off)，因它便于台式离心机上离心。

13）TE：10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.4，1 mmol/L EDTA。高压灭菌。

3. 方　　法

3.1　简并寡核苷酸引物的设计

简并寡核苷酸引物的设计是克隆成功的基本要求。作者在设计过程中遵循下列一些原则：

1）首先写出氨基酸序列，然后据此推断其核苷酸序列（或互补序列用于设计下游引物)，这里应考虑到所有可能的排列。例如氨基酸序列亮氨酸（Leu）/异亮氨酸（Ile）/甘氨酸（Gly）/谷氨酸（Glu）的简并核苷酸序列为 5′-YTN-ATH-GGN-GAR-3′（参见表 36.1）。如果氨基酸序列较长，可设计两条甚至更多的简并引物。如仅仅设计一条简并引物，则尽量选用那些 GC 含量最高的序列，因为这类引物的复性条件更为严格，例如更高的复性温度（参见注释 1）。

2）在推导的核苷酸序列中计算其排列的数目。序列 5′-YTN-ATH-GGN-GAR-3′的排列数为：(2×4）×3×4×2＝192（种）。通过引入猜测多聚体，其简并性会有所降低。如果这一引物用于克隆人类基因，可以应用的一个有用的猜测体将是 5′-CTB-ATY-GGN-GAR-3′，它仅仅含有 64 种排列[2]。引物的 3′端必须包括氨基酸序列所有可能的排列，因 *Taq* DNA 聚合酶无法对 3′端错配的引物进行延伸。

3）引物的简并性还可用次黄苷替代“不能猜测”的核苷酸以求进一步减少，因为这一种合成的核苷能与所有 4 种天然碱基通过氢键配对。如此，上述序列将变为 5′-CTB-ATY-GGI-GAR-3′，仅有 12 种排列数目。不过，由于采用次黄苷将降低复性温度，可能会由于非特异性扩增而导致更高的本底。

4）引物的 5′端应尽可能引入限制酶切位点以利于克隆到质粒载体中去。如果每一条引物都添加了不同的限制酶切位点，PCR 产物就可直接用于克隆。应注意到并非所有的限制酶都能识别双链 DNA 分子末端的同族位点。但在限制酶切位点之前加上 2～4个核苷酸的 5′端突出可避免这一困难（参见注释 2）。可采用的最佳限制酶切位点是 *Eco*R Ⅰ，*Bam*H Ⅰ和 *Xba* Ⅰ[3]。可能发生的一种难以预见的困难是当所加的限制酶切位点同样存在于扩增产物内部，如果这样则只有扩增产物的一个部分将被

克隆到。

5) 最后的考虑是引物 3′端最后一个核苷酸的类别。引物的 3′端核苷酸最好选用 G 或 C，而不是 N、I 或 T，因为胸苷和次黄苷都不能特异性地引导任何序列。由于鸟苷与胞苷间具有三个氢键，比 A:T 碱基对中的两个氢键更为牢固，所以鸟苷和胞苷更为可取。

3.2 简并寡核苷酸引物的 PCR 克隆

克隆的第一步是确定位于简并引物之间的核苷酸序列（图 36.1，步骤 1）。新合成的 cDNA 可用作这些反应的模板，但作者更喜欢用 cDNA 文库（参见注释 3）。载体 DNA 应该用相同的引物进行的扩增作为阴性对照。

1) 于 0.5 ml 微型离心管内依次加入已经高压灭菌的双蒸水 58.5 μl，热变性文库 DNA 5.0 μl，简并引物各 5.0 μl，10 μl 10×PCR 反应缓冲液，16 μl dNTPs 贮存液，热稳定 DNA 聚合酶 0.5 μl。如果须同时进行几个反应，可由下列成分配制基本溶液：双蒸水、引物、反应缓冲液、dNTPs 和 *Taq* DNA 聚合酶。这一反应混合液应于最后加入（参见注释 4、5）。
2) 短暂涡旋振荡每一样品，于微型离心机中离心 10 s。
3) 用 2～3 滴矿物油覆盖每一样品。
4) 用以下循环参数扩增：步骤 1：94℃ 变性 60 s；步骤 2：50℃ 复性 90 s（参见注释 6）；步骤 3：72℃ 延伸 60 s。扩增 24 个循环，接着步骤 4：72℃，4 min，步骤 5：保持于 10℃。
5) 从热循环仪中取出反应管，加入 200 μl 氯仿。在微型离心机上离心 10 s，使水层与油-氯仿层分离。
6) 小心地将水相转移到另一干净的微型离心管中。如果带入少量的油-氯仿层，必须再用 100 μl 氯仿抽提以除去油-氯仿层。
7) 各取 10 μl 初次反应产物，按上述方法和循环参数设置 4 管再次扩增。全部样品再次用氯仿抽提去除油后将 4 管反应产物一起倒入一个 1.5 ml 微型离心管中。
8) 于 300 μl PCR 反应产物中加入 150 μl 7.5 mol/L 醋酸铵，短暂涡旋振荡以混匀。加 1 ml 100% 乙醇以沉淀 DNA。涡旋振荡 5～10 s，冰浴 15 min。
9) 用微型离心机在 4℃ 中以 12 000 *g* 离心 10 min 以沉淀 DNA。弃上清液，用 500 μl 70% 乙醇淋洗沉淀。短暂涡旋，4℃ 中再次离心 5 s。弃乙醇，于室温中将离心管敞开倒置以凉干沉淀。或置于 Speed-Vac 中 2～10 min 以干燥沉淀。用 100 μl 双蒸水重悬 DNA。

扩增的 DNA 可直接用于测序或克隆。如果简并引物引入了新的限制酶切位点，DNA 应经酶切并凝胶纯化，然后克隆入合适的质粒载体。或者 DNA 用 T-载体方法（参见第三十七章）进行平末端克隆。如果扩增产物＞400 bp，可用琼脂糖凝胶纯化（参见第二十八章），如果＜400 bp，则应用聚丙烯酰胺凝胶纯化（参见第十三章）。

3.3 应用锚式 PCR 克隆 cDNA 5′端或 3′端

最初的简并 PCR 方案只能分离保守基因内的一段序列。锚式 PCR 可用于获得这一基因的其余的 5′端和 3′端区域。载体 DNA 仍应用相同的引物进行 PCR 扩增作为阴性对照。

1) 依次于若干 0.5 ml 微型离心管中加入以下成分：双蒸水（已高压灭菌）53.5 μl，热变性文库 DNA 10 μl，内部引物 5.0 μl，与载体同源的引物 5.0 μl，10×PCR 反应缓冲液 10 μl，dNTP 贮存液 16 μl，*Taq* DNA 聚合酶 0.5 μl。
2) 短暂涡旋振荡每一样品，在微型离心机中离心 10 s。
3) 加入 2～3 滴矿物油覆盖样品。
4) 用以下循环参数扩增：步骤 1：94℃ 变性 60 s；步骤 2：54℃ 复性 60 s（参见注释 6)；步骤 3：72℃ 延伸 60 s。扩增 31 个循环，接着步骤 4：72℃，4 min，步骤 5：保持于 10℃。
5) 从热循环仪中取出反应管，加入 200 μl 氯仿。在微型离心机上离心 10 s 使水层与油-氯仿层分离。
6) 小心将水相转移到另一干净的微型离心管中。如果带入少量的油-氯仿层，必须再用 100 μl 氯仿抽提以除去油-氯仿层。
7) 用离心透析柱离心去除 DNA 扩增产物中剩余的核苷酸及引物（参见注释 6 和 7)。DNA 仍滞留在膜上，而核苷酸及引物则滤过。加 400 μl TE 淋洗样品，并再次离心使其浓缩。再淋洗一次。于样品中加入 TE 使终体积为 50 μl，将样品移入一干净的灭菌管中。
8) 取 5 μl PCR 产物用原来的引物再次扩增。或者如可能则用第二条引物替代原来的一条引物。按 3.2. 节第 8、9 步的方法纯化产物。

4. 注　　释

(1) 进行 PCR 克隆时，一个关键性的参数是引物复性温度的选择，当使用简并引物时尤其如此。引物的复性温度（T_m）按下法计算：每一个 A:T 碱基对加 2℃，每一个 G:C 碱基对加 3℃，每一个 N:N 碱基对加 2℃，每一个 I:N 碱基对加 1℃。多数文献建议你计算 T_m值，然后把复性温度设定在比最低的 T_m值再低 5～10℃。按这一规则[4]曾克隆到关系疏远的超级基因家族中的成员。不过，作者发现较高的复性温度有利于减少非特异性复性，这对含有简并引物的反应会产生显著影响。
(2) 在设计带有限制酶切位点和 5′端突出的引物时，应注意到 5′端突出不可含有与限制酶切位点 3′端相紧接部位互补的序列，因为这将导致引物二聚体的形成。考虑这样一个引物：5′-ggg. aagctt. CCCAGCTAGCTAGCT-3′，在 5′-ggg 和 CCC-3′间有一 *Hin*dⅢ的酶切位点。5′端的 12 个核苷酸形成的回文序列极易与另一相同的引物形成二聚体。5′端突出较好的选择应是 5′-cac。
(3) 用文库 DNA 作为模板有一个可能发生的问题是某些序列并未与主要的序列一起被

克隆，因而被低估。如初次克隆失败，或者须尝试不同的文库，或者直接从未经克隆的 cDNA 进行扩增。

(4) 非离子去污剂如 Nonident P-40 能用于 PCR 分析样品的制备而不明显地影响 *Taq* 酶的活性[5]。在某些情况下，这些去污剂则是绝对需要的，因为只有用这些去污剂才能可重复地检测由模板的链内或链间二级结构导致的专一性 PCR 产物[6]。四甲基氯化铵能减少引物非专一性复性，从而提高 PCR 反应的特异性[7]。

(5) 所有 PCR 反应的加样过程应于超净台内进行，并使用正向置换移液器或带滤膜的吸嘴以防止 DNA 对样品、引物、dNTP、反应缓冲液的污染。同样地，用于 PCR 的所有样品、引物、dNTP、反应缓冲液制备和分装时均应采用相同的预防措施。

(6) 在进行巢式 PCR 扩增之前，去除前次 PCR 反应的引物是必要的，但如果使用同一引物则无此必要。

(7) 如 PCR 产物＞500 bp（参见第二十八章）可用玻璃珠纯化。由于玻璃珠对＜500 bp 的产物极少结合，故可有效地去除 PCR 产物的小分子污染物。

致　谢

感谢同事们给予的支持及参与有益的讨论，尤其要感谢 Eric Fearon 在技术上提供的帮助。同时感谢 Peter Agre 无私的支持，是他同意详细发表这些方案。此工作部分受 NIH 基金（项目 HL33991）给予 Peter Agre 的资助所支持。

参 考 文 献

1. Pao, G. M., Wu, L.-F., Johnson, K. D., Höfte, H., Chrispeels, M. J., Sweet, G., Sandal, N. N., and Saier, M. H., Jr. (1991) Evolution of the MIP family of integral membrane transport proteins. *Mol. Microbiol.* **5,** 33–37.
2. Wada, K.-N., Aota, S.-I., Tsuchiya, R., Ishibashi, F., Gojobori, T., and Ikemura, T. (1990) Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. *Nucleic Acids Res.* **18,** 2367–2411.
3. Appendix of any New England Biolab enzyme catalog.
4. Zhao, Z.-Y. and Joho, R. H. (1990) Isolation of distantly related members in a multigene family using the polymerase chain reaction technique. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **167,** 174–182.
5. Weyant, R. S., Edmonds, P., and Swaminathan, B. (1990) Effects of ionic and nonionic detergents on the Taq polymerase. *BioTechnology* **9,** 308,309.
6. Bookstein, R., Lai, C.-C., To, H., and Lee, W.-H. (1990) PCR-based detection of a polymorphic Bam HI site in intron 1 of the human retinoblastoma (RB) gene. *Nucleic Acids Res.* **18,** 1666.
7. Hung, T., Mak, K., and Fong, K. (1990) A specificity enhancer for polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **18,** 4953.
8. Preston, G. M. and Agre, P. (1991) Isolation of the cDNA for erythrocyte integral membrane protein of 28 kilodaltons: member of an ancient channel family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88,** 11,110–11,114.

第三十七章　应用 T-载体克隆 PCR 产物

Michael K. Trower, Greg S. Elgar

1. 引　　言

PCR 因能扩增特异性 DNA 序列[1~3]，使分子生物学家操纵核酸的方法发生了巨大的变革。它的应用十分广阔[4]，许多应用须将扩增得来的 DNA 产物克隆入载体后作进一步的分析。这通常可通过所谓“黏端”克隆来实现，在这一方法中于 PCR 引物的 5′端引入限制酶识别位点[5]。扩增反应后纯化 DNA 片段，用合适的限制酶消化并与相同的限制酶酶切后的载体相连接。在线状 PCR 产物的末端获得有效的酶切较为困难[6]，而且会导致存在于扩增片段内部的限制酶切位点被切。这种方法的一个独特的优点是通过设计的酶切位点，PCR 产物可被强行克隆，例如一个作为前导信号序列的 DNA 片段可以与结构基因融合成同步结构，用于基因表达的研究。

如果不需要准确的同步性，平末端克隆是克隆 PCR 产物的另一种选择。这一方法由于 *Taq* DNA 聚合酶具有内在的末端转移酶活性而变得复杂化，它倾向于在 PCR 产物的 3′端加上不依赖于模板的单个脱氧腺苷酸残基（A）[7]。这一 PCR 产物经纯化后，须经具 3′→5′外切核酸酶校对活性的 DNA 聚合酶（如 Klenow 或 T4 DNA 聚合酶）作用以形成平末端，然后才能与平末端载体相连[8]。但不幸的是，尽管可采用蓝/白 β-半乳糖苷酶颜色选择，在筛选时常常发现大多数的质粒并不含有插入片段。

近年来报道的另一些克隆 PCR 产物的方法中利用 *Taq* DNA 聚合酶的末端转移酶活性[9,10]。这些方法可使效率提高到平末端克隆法的 50 倍以上。这些方法有赖于某些克隆载体（T-载体）的构建，当这种载体线性化后，它每条臂的 3′端均带有一脱氧胸苷（T）。这就使它能与经 *Taq* DNA 聚合酶作用后末端带有脱氧腺苷的 PCR 产物直接进行黏端连接，而无须对 PCR 产物进行进一步的酶学处理。

在 Smith 等[9]的方法中通过核酸内切酶消化特殊的质粒以产生载体的延伸部位。Marchuk 等[10]描述的方法则利用 *Taq* DNA 聚合酶的末端转移酶活性，于酶切后的载体平末端加上脱氧胸苷残基（T）而制得（如图 37.1）。后者有两大优点：首先，可从许多分子生物学实验室中常用的克隆载体制备 T-载体，第二，因载体的自身连接率低，故产生的本底亦低。下面详细介绍这一方法，包括引物的设计，PCR 反应的进行，PCR 产物的分离，T-载体的构建以及如何利用 T-载体来克隆 PCR 产物。

2. 材　　料

所有试剂均用灭菌蒸馏水制备，除特殊声明外均贮存于室温。

2.1 PCR 反应及产物分离

1）PCR 引物：稀释合成的寡核苷酸引物至浓度为 10 mmol/L（参见注释 1），－20℃保存。引物设计是 PCR 反应成功的关键（参见注释 2 和 3）。

2）10 × PCR 缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl、pH 8.3（25℃），500 mmol/L KCl，15 mmol/L $MgCl_2$，0.1%（w/v）明胶。于 50℃中待明胶充分溶解后过滤除菌，于－20℃保存。

3）dNTP 混合物：溶于蒸馏水，每一种 dNTP 的浓度为 2 mmol/L。dNTP 母液可从公司购得，如 Pharmacia（Piscataway，NJ）、Boehringer（Indianapolis，IN）。我们发现这些产品既方便又可靠。－20℃保存。

4）矿物油。

5）*Taq* DNA 聚合酶：5 U/μl，－20℃保存。

6）PCR 终止混合物：25% Ficoll 400，100 mmol/L EDTA，0.1%（w/v）溴酚蓝。

7）琼脂糖凝胶：在 TAE（50 × TAE：242 g Tris 碱，57.1 ml 冰醋酸，100 ml 0.5 mol/L EDTA、pH 8.0）或 TBE（10 × TBE：121 g Tris，55 g 硼酸，7.4 g/L EDTA）中熔化电泳级的琼脂糖，缓慢煮沸（可用微波炉）。冷却至手握不烫时倒入胶模。在 100V 左右跑小型凝胶，用终止缓冲液中的染料作为迁移示踪剂（参见注释 4）。

8）酚：超纯度的酚在 TE 中平衡饱和。4℃保存。

9）氯仿：按 29:1 与异戊醇混合。

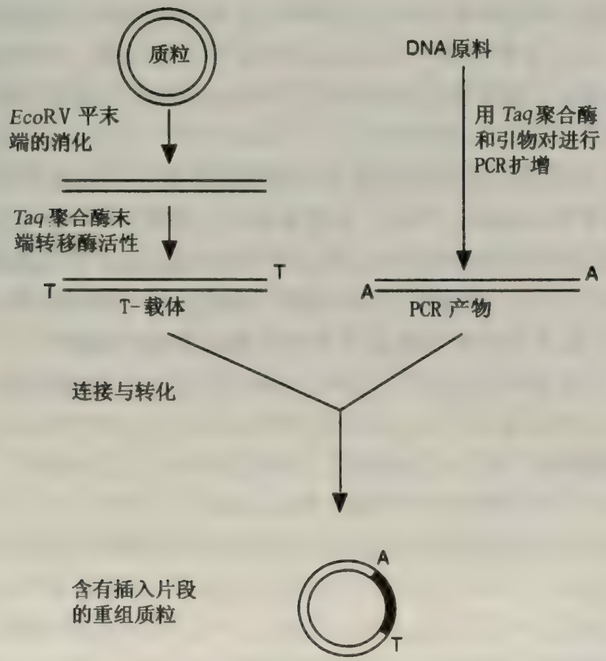


图 37.1　用 T-载体克隆 PCR 产物的示意图。

2.2 T-载体制备、连接及转化

10）载体 DNA：合适的载体如 pBluescript Ⅱ（Stratagene，La Jolla，CA）少量制备的 DNA[11]。－20℃保存。

11）限制酶：如 *Eco*RV，*Sma* Ⅰ，或其他平末端切割酶。－20℃保存。

12）dTTP：100 mmol/L 贮存液。分小份保存于－20℃。

13）10×PCR 缓冲液：0.5 mmol/L Tris-HCl、pH 7.6，100 mmol/L $MgCl_2$，500 μg/ml 牛血清白蛋白（BSA）。－20℃保存。

14）DTT：100 mmol/L 的二硫苏糖醇贮存液。分小份保存于－20℃。

15）ATP：用于连接反应，10 mmol/L 的贮存液。分小份保存于－20℃。

16）T4 DNA 连接酶：T4 DNA 连接酶可从多家供应商处购得。其活性常以 Weiss 单位（焦磷酸置换反应）或环化形成单位或以生产厂家自己的单位（例如，λ/*Hin*dⅢ酶切片段连接反应）表示。所以尽管通常用 0.5 μl 已足够，最好按照产品说明书选择连接酶的用量。保存于－20℃。

3. 方　　法

3.1 PCR 反应及产物分离

设置一套能确保对靶 DNA 序列进行特异性扩增的 PCR 反应条件并非易事。以下所提供的基本方案，在大多数情况下我们已证明是行之有效的，因此在进行任何修改之前，应首先经过试用。尽管如此，我们建议对 PCR 不熟悉的读者参看注释 5～8 及第三十五章。

虽然可取部分 PCR 反应混合物直接与 T-载体连接，我们发现如事先对 DNA 产物进行纯化，连接效率将会提高。对此，有许多建议，例如在第 6、7 步中的描述。

1）按下列方法配置 PCR 反应混合物。在 0.5 ml Eppendorf 管内加引物各 5 μl，10×PCR 缓冲液 5 μl，dNTP 混合液 5 μl，DNA 模板 1 μl（参见注释 9），蒸馏水 29 μl，总体积为 50 μl。在反应体系上覆盖足量的矿物以油防止蒸发。

2）Eppendorf 管置于热循环仪上 95℃加热 5 min。加 *Taq* DNA 聚合酶 0.3 μl，“热启动”反应。

3）立即开始后续的程序扩增 30～35 循环（参见注释 10）：变性 95℃、30 s，引物复性 50～60℃、30 s，引物延伸 72℃、30 s～3 min。

4）最后一循环后于 72℃额外延伸 5 min 以确保引物延伸得以完成而生成全长的双链 DNA。

5）加 1 μl PCR 终止混合液至 5 μl PCR 产物中，于 1.5%琼脂糖凝胶上电泳以检测 PCR 反应的得率和特异性。预期的 PCR 产物得率为 10～50 ng DNA/μl 反应液。

6）无论 PCR 产生单一条带或数条条带，全部都可能是正确的扩增产物。全部 PCR 反应混合物可经酚/氯仿抽提，乙醇沉淀，重悬于 10 μl TE 或蒸馏水中（参见注释 11）。

7）若同时出现不想要的条带，整个反应应于低熔点琼脂糖凝胶上电泳，用干净的刀切割回收目的条带。切割条带时最好用发射长波的紫外线（365 nm），这样对 DNA 的损伤较小。有多种方法纯化回收凝胶内的 DNA（参见注释 11）。

3.2 T-载体的制备、连接、转化

T-载体的制备包括首先用限制酶消化克隆载体产生平末端，接着利用 *Taq* DNA 聚合酶的内在末端转移酶活性使经切割载体加上 T-残基。这一简单的操作过程使得任何带有平末端酶切位点的克隆载体经相应酶切（如 *Eco*RV、*Sma* Ⅰ）消化后均可制备 T-载体。pBluescript Ⅱ载体系列（Stratagene）能很好地满足这一要求，因其多接头处含上述两种酶切位点。T-载体可成批制备，因而可以用于许多反应。例如 5 μg T-载体 DNA 足以供给 100 次克隆实验用。

体外扩增反应后，分离的 PCR 产物可应用与黏端克隆相同的反应条件直接将它连在制备好的 T-载体上。每一连接反应所需 PCR 产物的最适量较难估计，因为这与 PCR 产物的得率、复杂性及 *Taq* DNA 聚合酶的末端转移活性对 DNA 产物的加 A 作用效率有关。为确保 PCR 产物的量处于成功克隆所需量的范围之内，我们常设置两个连接反应，其中之一用 1∶10 稀释的纯化 DNA。

1）用限制酶消化 5 μg 载体 DNA，使其产生独特的平末端位点。例如用 *Eco*RV、*Sma* Ⅰ，于 37℃ 消化 2 h（参见注释 12）。
2）酶切产物于 1% 低熔点琼脂糖凝胶上电泳。于紫外灯下切下含线性载体 DNA 的凝胶，酚/氯仿抽提，乙醇沉淀（参见注释 11、13）。在 0.5ml Eppendorf 管中用 20 μl 水重悬产物。
3）加 10×PCR 缓冲液 5 μl，100 mmol/L dTTP 1 μl，蒸馏水 24 μl，*Taq* DNA 聚合酶 0.4 μl。覆盖 40 μl 石蜡油，72℃ 保温 2 h。为方便起见可用热循环仪。
4）用酚/氯仿抽提，乙醇沉淀以纯化 T-载体。最后，重溶于 100 μl TE 或蒸馏水中，浓度为 50 μg/μl。
5）于 3 个管内分别加入：1.0 μl PCR 产物、1.0 μl 1∶10 稀释的 PCR 产物、1.0 μl 蒸馏水（作为对照以了解载体自身连接产生的本底）。每管加入下列成分：制备的 T-载体 1.0 μl，10×连接缓冲液 1.0 μl，DTT 1.0 μl，ATP 1.0 μl，蒸馏水 4.5 μl，T4 DNA 连接酶 0.5 μl。于 16℃ 保温过夜。
6）取 5.0 μl 每一连接产物转化合适的感受态大肠杆菌（参见注释 14）。

一般转化后可分离得到数百个菌落（参见注释 15～17）。如果采用蓝/白克隆选择方法，我们通常发现它们的比例约为 50%。可从白色菌落，或者如未采用非重组体的鉴别方法，则从随机的菌落中筛选插入片段。图 37.2 显示一典型的 PCR 克隆实验结果。

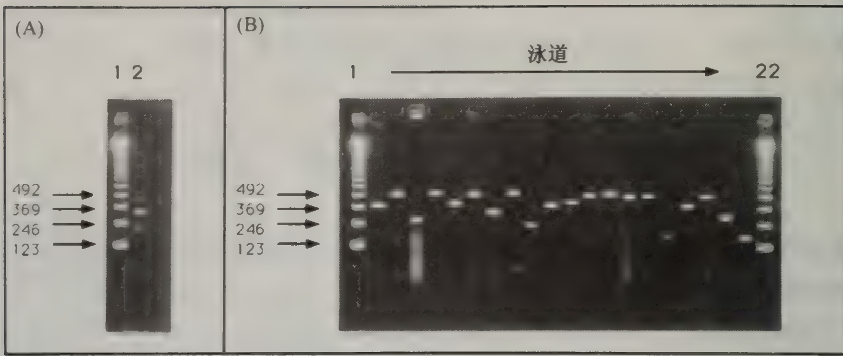


图 37.2 （A）用一对简并引物作 PCR 用以扩增复杂生物的基因组 DNA。从 PCR 反应产物的琼脂糖凝胶电泳分析的结果中可以看到一系列复杂的条带，其中一个主要条带长约 340 bp（B）。因靶序列的期望大小为 200～400 bp，PCR 产物按 3.1 节第 6 步的方法纯化，然后与 T-载体 pBluescript Ⅱ SK（+）相连接，并转化 *E. coli* XL1-Blue 株。经含 X-gal 及 IPTG 的氨苄青霉素（100 μg/ml）平皿筛选，在获得的约 200 个菌落中，蓝/白菌落各占一半。19 个白色及 1 个蓝色菌落用 T3 及 T7 侧翼通用引物通过 PCR 进一步测定克隆片段的大小及上述方法的效率（参见第三十五章）。扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳鉴定。上图 B 显示：19 个白色菌落 PCR 产物约为 500 bp。因载体多接头片段为 166 bp，故插入片段实际长度约为 340 bp，这一结果同时亦证实了 PCR 的正确克隆。（A）1.5% 琼脂糖凝胶电泳。泳道 1 为 123bp 阶梯相对分子质量标准（Life Technologies），泳道 2 为 PCR 产物。（B）19 个白色菌落（泳道 2～20）和 1 个蓝色对应菌落（泳道 21）用 T3 和 T7 通用引物的 PCR 筛选结果。泳道 1 和 22 都是 123bp 阶梯相对分子质量标准。

4. 注　　释

(1) 我们发现用凝胶或高效液相色谱法对我们列出的这样大小的引物进行纯化并非必要。我们常规将引物沉淀后溶于 200～500 μl 灭菌蒸馏水或 TE 缓冲液中。它们的浓度可用分光光度计测定（1 OD_{260} = 20 μg 单链寡核苷酸）。按每个碱基的平均相对分子质量为325计估算出物质的量，并将每份引物贮存液稀释到10 μmol/L 的溶度。

(2) 设置 PCR 反应的首要步骤是选择一对寡核苷酸引物。尽管尚无一种可供遵循的过硬、快速的引物设计规则能绝对确保扩增出目的 DNA 片段，设计引物时如果参照我们列出的一些指南，会增加成功扩增出靶 DNA 序列的机会。

a. 通常应考虑待扩增片段的两个末端序列的资料（17～25 bp）（参见注释 3）。从实践意义出发，扩增片段不宜超过 3～4 kb（参见注释 10）。

b. 从复杂的基因组 DNA 中扩增靶片段，我们发现 20～24 个碱基的长度已足够使靶序列作特异性的扩增；对于比较简单的 DNA，例如质粒 DNA，引物长度可减少至 17 bp，可以制备更长的引物，但是这一则浪费，二则并不必需。

c. 引物，尤其 3′端必须与靶序列配对良好。如有可能，使每条引物的 G/C 含量保持在大约 50%，并应避免同一碱基连续重复过多。两条引物长度应相仿。

d. 为防止形成引物二聚体，两条引物，尤其 3′端不能有明显的互补性。否则会相互杂交形成非常有效的 PCR 反应底物而扩增成为主要的产物[13]。

e. 当 PCR 扩增是为了克隆一已知的基因或其同源基因，须检索 EMBL/基因库资料以确保引物对模板 DNA 的特异性。

f. 牢记引物的长度及 G/C 含量决定着 PCR 反应的最适复性温度。目前已有大量的电脑程序可供选择，用于设计针对特异性靶序列的引物。

(3) 用 PCR 方法从复杂的基因组克隆一段序列时设计引物的困难之一在于靶区域的确切序列往往是未知的。因此必须根据不同的生物中已报道的相同基因或相类似基因的序列资料进行推断。对于结构基因，其已知的 DNA 序列同源区须先翻译成蛋白质，并排列成队。计算机的许多列队程序例如 CLUSTAL[14] 可协助进行这项工作并识别出保守区域。特别应寻找保守区内带有低简并性的氨基酸序列，尤其是那些仅具一个密码子的氨基酸，如甲硫氨酸（Met）、色氨酸（Trp）；以及两个密码子编码的氨基酸，如天冬酰胺（Gln）、天冬氨酸（Asp）、半胱氨酸（Cys）、谷胺酰胺（Gln）、谷氨酸（Glu）、组氨酸（His）、赖氨酸（Lys）、苯丙氨酸（Phe）、酪氨酸（Tyr）；按照这些氨基酸设计的引物可降低它的简并性。尽可能避免选用那些具有 6 个密码子编码的氨基酸（亮氨酸 Leu、丝氨酸 Ser、精氨酸 Arg）来设计引物[15]。另外，在设计引物时尚须考虑所研究特定生物的密码子选择，这可通过查表获得。最后，将可以获得的最为保守的序列资料定位于引物的 3′端。

(4) 当制备琼脂糖凝胶时，若用试剂盒（如 GeneClean）则记住以 TAE 为缓冲液更方便。对于≤100 bp 的扩增片段应用＞2％的凝胶，对于 300～400 bp 的扩增片段可用 1.5％的凝胶，以低相对分子质量的相对分子质量标准，如 123 bp 阶梯（Life Technologies Inc，Gaithersburg，MD）或 pBR322/*Msp* I 酶切片段作为 PCR 产物的电泳标准较为可取。

(5) 为提高扩增反应的特异性，可对 PCR 基本反应体系作许多调整。尽管考虑到诸多因素，PCR 反应的非特异性扩增似乎因非特异性引物复性而难以杜绝。对扩增产物得率及复杂性产生最大影响的参数是引物的复性温度。通过提高复性温度时因引物的结合更为严格，反应的特异性将会提高。但如复性温度过高，扩增产物的得率会减少，甚至扩增不出来。通过试验不同的复性温度，往往可以选出某对特定引物的最适 PCR 条件。在 0.5～5 mmol/L 的终浓度范围内改变 PCR 缓冲液中 Mg^{2+} 浓度也可能改善扩增特异性。另外，在 5％～10％（w/v）范围内 DMSO 也可提高 PCR 的特异性。如上述尝试均告失败，则用另外一对处于前一对引物内侧的（巢式）引物，对上述扩增产物进行再一次扩增[2]。

(6) PCR 反应即使按优化模式进行，仍可能出现一些似是而非的扩增产物。我们发现这常常是由于其中一条引物的特异性双重引导模板扩增的结果。因此我们常规设置只含一条引物的扩增体系与上述体系同时扩增，并于琼脂糖凝胶相邻的泳道上进行电泳，从而区分这些产物是由于两条引物相互作用或由一条引物造成。

(7) *Taq* DNA 聚合酶缺乏 3′→5′外切核酸酶校正活性[16]，所以在 DNA 扩增中积累的 PCR 产物的错配率可高达 2×10^{-4}[3]。这种错误出现于早期的扩增产物时，它将存在于一部分扩增分子中，因而也将出现在许多克隆中。因此当分离未知片段时，我们建议必须对来自相互独立的至少三个 PCR 产物进行测序。

(8) 扩增反应的高度敏感性使其易于受微量外源 DNA 的污染。当靶序列量微且存在于

复杂的基因组中时，因常须进行多轮 PCR 扩增而尤其成为问题。为避免这样的污染的办法包括：戴手套，使用带过滤装置的吸嘴，试剂和试管用紫外线处理，以及必要时工作可于超净台上进行。

(9) 模板 DNA 可来源于基因组 DNA、cDNA、从 YAC 制备的 DNA、黏粒、λ、质粒及 M13 噬菌体，而且可以是双链或者单链。DNA 来源的复杂性愈高，所须 DNA 的量也愈多，这可作为一项指南。例如使用复杂的基因组 DNA 或质粒 DNA，它们的浓度分别是 10～100 μg/ml 和 1～10 μg/ml。模板量过多会降低扩增效率。另外，从单个克隆的 λ 噬菌体贮存液或噬菌斑、含质粒的菌落或甘油贮存液、M13 噬菌斑直接挑取或吸取少量作为模板，我们也成功地完成了扩增。

(10) 作为复性温度的粗略计算：每增加一对 G/C 增加 4℃，每增加一对 A/T 增加 2℃。$T_m = 4\times(G+C)+2\times(A+T)$。因此长度为 18 bp 具有10(G+C)的引物的复性温度为：$10\times4+8\times2=56$（℃）。引物延伸时间按 1 kb/min 计；从实践的角度出发，*Taq* DNA 聚合酶扩增的能在凝胶上显示并能纯化并克隆的最大片段长度大约为 3～4 kb。

(11) 以下为用于纯化 PCR 产物的两种常用方法，直接纯化 PCR 产物或者先经从琼脂糖凝胶分离后再行纯化：

a. 酚/氯仿抽提。加等体积酚，混匀，以 13 000 *g* 离心 10 min。吸取（上层）水相至另一微型离心管内，加等体积氯仿，混匀，再次离心。吸取（上层）水相，加 1/10 体积 3 mol/L 醋酸钾和 2.5 倍体积乙醇，于 −20℃ 或干冰中静置 10 min。13 000 *g* 离心 10 min。弃上清液，用 70% 乙醇 200 μl 淋洗沉淀。空气中干燥或真空抽干，重悬于所需体积的 TE 或水中。如果从低熔点琼脂糖凝胶中回收 DNA，把切下的凝胶称重，加等体积水，在加入酚前于 65℃ 加热使胶完全熔化。

b. 试剂盒如 GlassMax（Gibco-BRL）中的 DNA 结合基质可用于纯化 PCR 产物。按产品说明书操作，同样也可以直接从 PCR 产物中，或凝胶沉淀后纯化 DNA。

(12) 如果能用 *Eco*RV，它比 *Sma* Ⅰ 更好，因为 *Eco*RV 在 37℃ 更为稳定，且对载体 DNA 的切割效率更高。如 DNA 中只含有 *Sma* Ⅰ 的平末端酶切位点，消化时保温温度应为 25℃。

(13) T-载体经凝胶纯化时未被消化的载体将被去除，这可减少没有插入片段的载体所造成的本底。

(14) 感受态大肠杆菌既可以按 Hanahan 的方法[17]（参见第二十九章）制备，也可以直接购得。

(15) 如果所用的载体具有 β-半乳糖苷酶蓝/白选择系统，在含 IPTG 及 X-gal 的培养基中进行转化，重组克隆将呈现白色。这是由于 β-半乳糖苷酶基因的插入失活，使其不能分解产色素的乳糖类似物 X-gal，从而阻止了蓝色菌落的形成。但白色菌落并不肯定带有重组体，这部分可能是由于载体误连了非匹配末端[18]或发生了移码。相反，某些蓝色菌落倒可能含有重组体，这可能是 β-半乳糖苷酶基因在框架内发生的变化并不影响读码，从而使酶仍然具有活性。

(16) 转化结果培养皿上未见有任何菌落，则或是由于大肠杆菌的低感受态，或是 PCR

产物与 T-载体连接失败之故。对每一批的转化均应设立对照质粒以监测大肠杆菌的转化效率。另外，可通过样品于琼脂糖凝胶上电泳，以确定 T-载体与 PCR 产物的浓度，并了解连接反应是否成功。

(17) 大量蓝色菌落的出现或者用筛选方法检测中发现高背景的非重组克隆，这大多是由于载体臂上加 T 的失败。重复此步可以确认试剂已经加全以及 *Taq* 酶并不失活。通过在不含 PCR 产物时的 T-载体连接反应可以确证 T-载体的制备已成功，在这种情况下转化后应该仅存在小部分非重组（蓝色）菌落。

致　谢

感谢剑桥大学医学部的 Sydney Brenner 为我们提供这一工作的机会。当时，作者之一 M. K. Trower 受 E. I. du Pont de Nemours and Co. Inc., Wilmington, DE, USA 的奖学金资助，另一作者 G. S. Elgar 则受 Jeantet 基金的资助。

参 考 文 献

1. Saiki, R. K., Scharf, S. J., Faloona, F. A., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A., and Arnheim, N. (1985) Enzymatic amplification of β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230,** 1350–1354.
2. Mullis, K. B. and Faloona, F. A. (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155,** 335–350.
3. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239,** 487–491.
4. Erlich, H. A., Gelfand, D., and Sininsky, J. J. (1991) Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* **252,** 1643–1651.
5. Scharf, S. J., Horn, G. T., and Erlich, H. A. (1986) Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* **233,** 1076–1078.
6. Kaufman, D. L. and Evans, G. A. (1990) Restriction endonuclease cleavage at the termini of PCR products. *Biotechniques* **9,** 304,305.
7. Clark, J. M. (1988) Novel non-templated nucleotide reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **18,** 9677–9686.
8. Hemsley, A., Arnheim, N., Toney, M. D., Cortopassi, G., and Galas, D. J. (1989) A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6545–6551.
9. Mead, D. A., Pey, N. K., Herrnstadt, C., Marcil, R. A., and Smith, L. (1991) A universal method for the direct cloning of PCR amplified nucleic acid. *Biotechnology* **9,** 657–663.
10. Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A., and Collins, F. S. (1991) Construction of T-vectors, a rapid and general system for direct cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* **19,** 1154.
11. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., eds. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual,* 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 1.25–1.28.
12. Güssow, D. and Clackson, T. (1989) Direct clone characterisation from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **17,** 4000.
13. Mullis, K. B. (1991) The polymerase chain reaction in an anemic mode: how to avoid cold oligodeoxyribonuclear fusion. *PCR Meth. Appl.* **1,** 1–4.

14. Higgins, D. G. and Sharp, P. M. (1988) CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* **73,** 237–244.
15. Wada, K., Wada, Y., Ishibashi, F., Gojobori, T., and Ikemura, T. (1992) Codon usage tabulated from the GenBank genetic sequence data. *Nucleic Acids Res.* **20(Suppl.),** 2111–2118.
16. Tindall, K. R. and Kunkel, T. A. (1988) Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Biochemistry* **27,** 6008–6013.
17. Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli,* in *DNA Cloning: A Practical Approach* (Glover, G. M., ed.), vol. 1, pp. 109–135.
18. Wiaderkiewicz, R. and Ruiz-Carillo, A. (1987) Mismatch and blunt to protruding-end joining by DNA ligases. *Nucleic Acids Res.* **15,** 7831–7848.

第三十八章　PCR 产物的直接放射性标记

Tim McDaniel，Stephen J. Meltzer

1. 引　　言

放射性标记的聚合酶链式反应产物在分子生物学研究技术中的应用越来越广。这里面包括基于 PCR 技术的一些多态性分析，例如连锁分析[1]及肿瘤细胞的等位基因缺失检测[2]。放射性标记 PCR 的其他应用包括：合成探针用于 Southern 杂交及 Northern 杂交[3]，以及用单链构象多态性分析（SSCP）技术进行多态性筛选及点突变分析等[4]。

PCR 产物的放射性标记最常用的方法有两种：于 PCR 反应体系中加入放射性标记的 dNTPs[1]以及在扩增反应前进行引物末端标记[5]，这两种方法均存在一些问题，如热循环仪易遭受放射性污染和扩展了同位素工作区域。这里描述的技术[6]是基于 O'Farrell 等[7]及 NelKin[8]的方法，在这里放射性标记是在 PCR 已完成并完全脱离 PCR 仪后进行，故可以克服上述缺点。另外，这一方法也是快速的，PCR 产物无须纯化(如酚/氯仿抽提)，并且在标记后 2 h 内可以肉眼看到极少量的 PCR 产物。

这一方法利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段的 5′→3′ DNA 聚合活性及 3′→5′外切活性（校正活性）。即于不含 dNTPs 的 PCR 反应产物中加入 Klenow 片段，这时因缺乏底物（dNTPs)，酶的 5′→3′ DNA 聚合活性得不到体现，而仅仅显示它的 3′→5′外切活性，于是 PCR 产物的 3′端碱基被去除，稍后再加入 dNTPs 包括 [^{32}P] -dCTP，依靠 Klenow 片段重新补齐末端，从而标记了 3′的缩进一端。

2. 材　　料

1）PCR 产物。

2）Klenow 片段（1U/μl)。

3）10 × Klenow 酶缓冲液：500 mmol/L Tris-HCl、pH 7.8，100 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L β-巯基乙醇。

4）[α-^{32}P] dCTP（脱氧胞核苷5′-[α-^{32}P]三磷酸，三乙胺盐，水溶液，10 mCi/ml，3000 Ci/mmol)。

5）dNTP 溶液（各含 400 μmol/L 的 dGTP、dATP、dTTP)。

6）测序酶终止液：95％甲酰胺，20 mmol/L EDTA，0.05％溴酚蓝。

7）DNA 测序装置（包括玻璃平板、垫片、梳子)。

3. 方　　法

1) PCR 产物 5′端[1)]的消化，于微量离心管内混匀 2 μl PCR 产物（来自 100 μl 反应体系），2 μl 10×Klenow 酶缓冲液，1 μl Klenow 片段，15 μl H_2O。
2) 室温静置 10 min。
3) 加入 0.5 μl [α-^{32}P] dCTP 和 1 μl dNTP 溶液以补平被消化的末端。
4) 室温静置 10 min（参见注释 1）。
5) 70℃保温 15 min 以灭活 Klenow 酶。
6) 此时根据实验需要掺入标记的 DNA，或者按下法于变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳以显示标记的 DNA。
7) 取 8 μl 标记混合液与 2 μl 测序终止液混匀。
8) 90℃加热 5 min 使双链 DNA 变性。
9) 上样于已经预电泳过的 8%丙烯酰胺/50%脲素测序胶上，电泳 90 min。电压维持在使凝胶表面温度达 50℃的水平（根据测序装置不同，电压亦不同）。
10) 用增感屏于 -70℃放射自显影 1.5 h（参见注释 2）。

4. 注　　释

(1) 为确保 3′端完全补平，可在 70℃保温灭活 Klenow 酶前补加 1 μl 400 μmol/L dCTP，反应 5 min。不过我们认为这并不必要。
(2) 为确认标记的 PCR 产物的大小，可与用同样方法标记的 DNA 相对分子质量标准同时电泳。为标记 DNA 相对分子质量标准，在上述操作中用 2 μl（2 μg）相对分子质量标准 DNA 取代 PCR 产物。

致　　谢

本文受 ACS 基金（#PDT-419）、美国 Crohn 和 Colitis 基金会及退伍军人事务部的支持。

参 考 文 献

1. Peterson, M. B., Economou, E. P., Slaugenhaupt, S. A., Chakravarti, A., and Antonarakis, S. E. (1990) Linkage analysis of the human HMG 14 gene on chromosome 21 using a GT dinucleotide repeat as polymorphic marker. *Genomics* **7**, 136–138.
2. Bookstein, R., Rio, P., Madreperla, S. A., Hong, F., Allred, C., Grizzle, W. E., and Lee, W.-H. (1990) Promoter deletion and loss of retinoblastoma gene expression in

1) 应是 3′端。——译者注

human prostate carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87,** 7762–7766.
3. Schowalter, D. B. and Sommer, S. S. (1989) The generation of radiolabeled DNA and RNA probes with polymerase chain reaction. *Anal. Biochem.* **177**, 90–94.
4. Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., and Hayashi, K. (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5,** 874–879.
5. Hayashi, S., Orita, M., Suzuki, Y., and Sekiya, T. (1989) Use of labeled primers in polymerase chain reaction (LP-PCR) for a rapid detection of the product. *Nucleic Acids Res.* **18,** 3605.
6. McDaniel, T. K., Huang, Y., Yin, J., Needleman, S. W., and Meltzer, S. J. (1991) Direct radiolabeling of unpurified PCR product using Klenow fragment. *BioTechniques* **11,** 7,8.
7. O'Farrell, P. H., Kutter, E., and Nakanishi, M. (1980) A restriction map of the bacteriophage T4 genome. *Mol. Gen. Genet.* **179,** 421–435.
8. Nelkin, B. D. (1990) Labeling of double stranded oligonucleotides to high specific activity. *BioTechniques* **8,** 616–618.

第三十九章　应用 PCR 技术快速筛选含克隆片段的菌落

Michael K. Trower

1. 引　　言

在连接反应产物转化进入感受态大肠杆菌后，成功的亚克隆通常用两种方法鉴定。第一种方法是从若干菌落小规模制备质粒 DNA，接着根据其独特的限制酶切图谱或直接 DNA 测序来确认目的重组质粒。第二种方法，当涉及大量的假定的重组子时，常用标记的探针进行菌落杂交。本章描述另一种基于 PCR 的方法，可以用来直接筛选转化子，这种方法既简便、快速又完全不须经历耗时的质粒 DNA 制备。简言之，用牙签将转化菌落直接挑入少量 PCR 反应液中，这里面含有克隆位点的侧翼引物，通常来源于载体多位点接头的通用引物[1]。随后在体外进行扩增，每一反应的一小部分用琼脂糖凝胶电泳分析以确证插入片段的存在及片段的大小。

2. 材　　料

这里描述的方法须用热稳定微量滴定板，但也可用 200～500 μl 薄壁管代替。所有试剂均用灭菌蒸馏水配置。除注明者外，其余均室温保存。

1）PCR 引物：合成的寡核苷酸引物（17～21 碱基），制成 10 μmol/L 贮存液，－20℃保存。
2）10×PCR 缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl、pH 9.0，50 mmol/L KCl，15 mmol/L $MgCl_2$，1% Triton X-100。－20℃保存。
3）dNTPs：贮存液含 dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 2 mmol/L，－20℃保存。
4）*Taq* DNA 聚合酶 5 U/μl，－20℃保存。
5）热稳定 96 孔微量滴定板（参见注释 1）。
6）丰富培养液。
7）灭菌的鸡尾棒（cocktail stick）[1]。
8）灭菌的培养用微量滴定板。
9）矿物油。
10）10×凝胶上样染料：25% Ficoll 400，100 mmol/L EDTA，0.1%溴酚蓝。

1）可用灭菌牙签代替。——译者注

3. 方　法

1) 确定所须进行筛选反应的次数（参见注释 2）。配置一 PCR 反应混合贮存液，其中每一待扩增菌落须用：各 0.5 μl 正向/反向通用引物（参见注释 3），1.0 μl dNTP 贮存液，1.0 μl 10×PCR 缓冲液，0.04 μl *Taq* DNA 聚合酶，6.96 μl 蒸馏水。
2) 取 10 μl 反应混合贮存液，加到热稳定 96 孔微量滴定板每一设定的孔内。
3) 对于每一被筛选的菌落，吸取 100 μl 丰富培养液（含抗生素及其他选择性药物）加到另一块微量滴定板的孔内。每孔标以号码，以便在分析扩增产物后特定菌落很容易被辨认出来。
4) 用灭菌的鸡尾棒挑取每一菌落，先于 PCR 反应混合液中漂洗，然后于含有新鲜培养液的滴定板的相对应的孔中漂洗(参见注释 4 和 5)。滴定板置 37℃ 保温箱中至少 6 h。
5) 按制造厂家的说明书提供的方法密封热稳定微量滴定板。如果热循环仪不具备热盖，则于反应体系上加盖足量的矿物油以防止蒸发（一般加 40～50 μl）。
6) 将板置于装有微量滴定金属板的热循环仪内，95℃ 加热 1 min。接着启动以下的程序扩增 30～35 个循环：95℃ 变性 30 s；50～55℃ 引物复性 30 s（如引物为 17 个碱基，复性温度为 50℃）；72℃ 引物延伸 30 s ～3 min（按合成 1 kb/min 计）（参见注释 6）。最后一个循环后于 72℃ 额外延伸 5 min 以确保合成全长的双链产物。
7) 每一反应孔加 1 μl 10×上样染料，用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳分析(参见注释 7 和 8)。
8) 培养用微量滴定培养板上的阳性克隆可取出用于接种培养以便制备质粒 DNA 用于进一步分析。

用于 PCR 的同一通用引物可作为克隆片段测序的起始引物，这取决于引物距克隆位点的距离(10～50 个碱基之间是合适的)(参见注释 9)。PCR 克隆实验的典型结果见图 39.1。

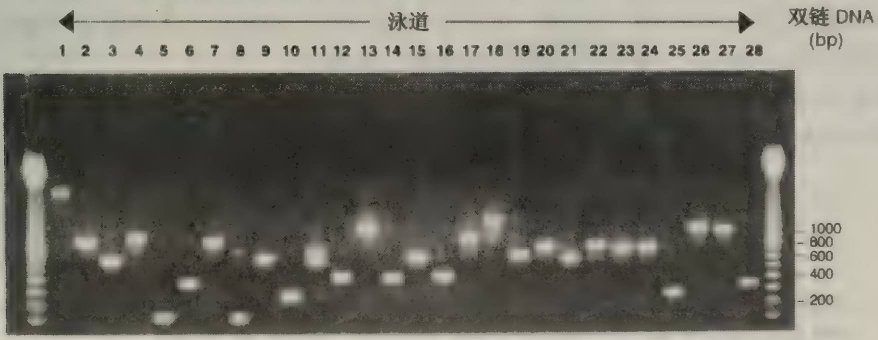


图 39.1　长短不一的 DNA 混合物被连接入载体 pCRscript SK(+)的 *Srf* I 酶切位点，并转化大肠杆菌(*E. coli*, XL1- blue 株)，用含有 X-gal 及 IPTG 的氨苄青霉素(100 μg/ml)平皿筛选，以 T3及 KS 通用多位点接头引物对筛选出的28个菌落进行 PCR 分析(泳道1～28)。结果显示每一个克隆都含有一个长短不一的插入片段。泳道5和8为由非重组子所产生的载体多位点接头衍生而来的123 bp 对应条带。泳道11有两个扩增片段，表明在扩增体系内挑入了两个克隆。

上述方案加以修改，可用于对定点诱变得来的 DNA 序列的筛选[2]；另外，未纯化的 PCR 产物亦可用于直接测序[3]。

4. 注　　释

(1) 多种型号的热循环仪均备有微量滴定板，如 Hybaid (Middlesex, UK)、MJ Research (Watertown, MA)(PTC 100及200)和 Perkin-Elmer(Norwalk, CT)(9600)，后者使用中不须覆盖矿物油层。

(2) 微量滴定板孔数从 10～96 不等，所需孔数由用于亚克隆的 DNA 的复杂性及所筛选 DNA 片段的种类多少而定。

(3) 用侧翼通用引物的一个独特的优点是重组子即使不含插入片段也能扩增出双链 DNA 条带，说明 PCR 反应是成功的。也可应用其他引物组合，例如采用一条通用引物及一条插入片段特异性引物，使所克隆的 DNA 片段方向得以确定。或者在缺乏任何的通用引物或当目的克隆片段>4 kb 的情况下，可选用一对插入片段特异性的引物。

(4) 这一筛选方法也可用于重组 M13 噬菌体克隆的筛选，惟一的修改是在培养液内加入 1/100 体积过夜培养的大肠杆菌。所选宿主菌株必须带 F′附加体，以便于噬菌体能感染这些细胞；合适的实验室菌株有 JM109、TG1、NM522、XL1-Blue。

(5) 如果所筛选的克隆数目较多，先将菌落挑入微量培养板中培养过夜。接着用 96 齿接种工具从培养孔接种到含有 PCR 反应混合液的微量滴定板的孔中。

(6) 从实际出发，筛选方案的上限为 3～4 kb。如果插入片段<500 bp，可选用快速的两步循环程序：于 95℃变性 30 s，或 50～55℃引物复性 30 s，共扩增 30～35 个循环。引物复性温度和变性温度之间的过渡时间对 *Taq* DNA 聚合酶延伸引物的作用来说已经足够。

(7) 所筛选的非重组子 PCR 产物的大小取决于克隆载体上的一对引物之间的距离。因此如果单一限制酶切位点被用于亚克隆时，重组子 PCR 产物的大小应加上这一长度。在估计插入片段的大小时这一点应予考虑。

(8) 或者取少量每一次 PCR 产物，加入上样染料后于琼脂糖凝胶上进行电泳。如 PCR 产物显示已知序列的单一条带，可取 2～5 μl PCR 产物进行限制酶切（酶切混合物体积为 20～50 μl），根据限制酶切图谱进一步确认。

(9) 即使 PCR 产物显示单一条带，其中也可能含有不止一种产物。因此对若干重组克隆进行测序是明智的，这便于确认目的片段的存在。

参 考 文 献

1. Güssow, D. and Clackson, T. (1989) Direct clone characterization from plaques and colonies by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **17,** 4000.
2. Trower, M. K. (1992) A rapid PCR dependent microtitre plate screening method for DNA sequences altered by site-directed mutagenesis. *DNA Sequence–J. DNA Sequenc. Map.* **3,** 233–235.
3. Trower, M. K., Burt, D., Purvis, I. J., Dykes, C. W., and Christodoulou, C. (1995) Fluorescent dye-primer cycle sequencing using *unpurified* PCR products; development of a protocol amenable to high-throughput DNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* **23,** 2348,2349.

第四十章　应用 PCR 技术筛选噬菌体文库

Lei Yu，Laura J. Bloem

1. 引　　言

从 cDNA 或基因组文库中分离一个克隆往往须从文库中多次接种及滤膜杂交以进行筛选。这不仅繁琐、耗时，并且常因此带来矫作物，例如滤膜杂交中常常出现假阳性。在常规滤膜杂交前的几轮筛选中采用聚合酶链式反应（PCR）可以减少上述问题。PCR 筛选有三方面的优点：① 阳性的克隆是根据凝胶中 DNA 条带的大小来判断，可避免滤膜杂交中的假阳性斑点造成的混淆；② 省时，尤其在前几轮筛选时；③ 通过应用合适的引物，可在同一 PCR 中对多个基因进行筛选。随着噬菌体群体的复杂性的减少和其中真阳性克隆得以确认后可用常规方法对单一克隆进行分离。

PCR 筛选的基本步骤如图 40.1 所示：

① 从文库平皿上取下滤膜；

② 从滤膜上洗下噬菌体颗粒；

③ 用噬菌体洗脱液进行 PCR。

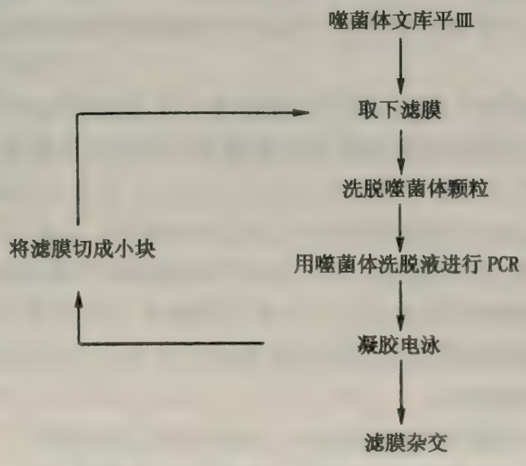


图 40.1　PCR 法筛选噬菌体文库的基本步骤。

从一特定平皿上鉴定了一个阳性信号后，从这一平皿上长满噬菌体的琼脂上切下一小块以缩小搜索的范围，然后重复这些步骤，进行另一轮次的 PCR 筛选。或者，可揭下阳性平皿的另一张滤膜，用作常规滤膜杂交。

2. 材　　料

1）噬菌体稀释缓冲液：100 mmol/L NaCl，8 mmol/L $MgSO_4$，50 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，0.1%明胶。高压灭菌，室温保存。
2）滤膜（参见注释 1）。

3. 方　　法

参见注释 2～4。

1）按标准方法[1]将噬菌体 cDNA 或基因组文库与合适的宿主细菌混合铺于含琼脂糖上层的 150 mm 平皿上，于 37℃ 培养。在形成大小合适的噬菌斑后，平皿置于 4℃ 中冷却至少 1 h。
2）在平皿上放一硝酸纤维膜，确保在琼脂和滤膜之间无气泡。如果平皿是新鲜的，滤膜将于数秒钟内湿润。对于已存放一段时间的平皿，或者要从平皿多次揭取滤膜，为使滤膜完全浸湿，可能需要较长的时间。
3）用两个平头镊子小心地将滤膜提起，确保勿使琼脂上层撕裂。使含噬菌体的一面向下将滤膜置于 150 mm 灭菌培养平皿中（平皿的底或盖都可以），平皿内含 3 ml 噬菌体洗脱缓冲液，反复上下提起滤膜数次以洗下噬菌体颗粒。最后，提起滤膜滴干液体（通常 10～20 s 已足够）。丢弃滤膜。
4）加 20 μl 噬菌体洗脱液至 PCR 管中，盖紧盖子，置于沸水中 5 min，于冰上冷却。以此为模板按常规进行 PCR（总体积 100 μl，PCR 条件见三十四章。参见注释 5、6）。如果以后要进行更多次的 PCR，保存一些噬菌体洗脱液在 Eppendorf 管中（参见注释 7）。
5）用琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物（参见注释 8）。如果一块平皿有一个或多个阳性噬菌斑，那么，与其相对应的泳道会出现预期大小的扩增条带。这一平皿可认为阳性平皿。
6）此时可用阳性平皿进行常规滤膜杂交以筛选阳性噬斑。但是也可以按下面所介绍的方法进行新一轮次的 PCR 筛选以进一步缩小一块阳性平皿噬菌体群体的复杂性。
7）取一新的硝酸纤维膜盖于阳性平皿上（参见注释 9）。用灭菌手术刀将滤膜及其下方的琼脂切成数块，琼脂可切成任何形状及数目。然而，我们发现如按放射状切成 4～8块，则操作很是方便。
8）同步骤 3，取每一滤膜切片在噬菌体洗脱液中漂洗。因滤膜切片较小，漂洗可在更小的，例如 100 mm 的培养皿中进行，或在干净保鲜膜（Saran Wrap™）上淋洗。这取决于滤膜切片的大小，一般可用 0.2～0.5 ml 的洗脱液。
9）用切片的洗脱液如步骤 4 进行 PCR。
10）通过 PCR 鉴别出含有阳性噬菌体信号的切片后，在相应的琼脂切块上再次印膜，并用此滤膜进行常规滤膜杂交。或者刮下此琼脂切块的顶层琼脂，按下法再次接种平皿。

11) 再次接种阳性琼脂切块上的噬菌体时，用一端套有一小段封口橡皮管的玻棒将上层琼脂刮入含有 20 ml 噬菌体洗脱缓冲液的 50 ml 锥形管中。为避免交叉污染，在刮不同琼脂过程中，玻棒必须用灭菌水认真清洗。

12) 将锥形管剧烈涡旋振荡，顶层琼脂须浸泡 2 h 到过夜。以 800 *g* 离心 5 min 以沉淀琼脂，将部分上清液液保存在 Eppendorf 管中，丢弃含琼脂的锥形管，检测噬菌体滴度，按所需密度重新接种，进行新一轮 PCR 筛选或常规滤膜杂交。

4. 注　　释

(1) 各种品牌的不带电荷的膜，无论是硝酸纤维膜或尼龙膜都适用于此项操作。但我们发现如使用带电荷滤膜，这上面的噬菌体颗粒不易洗脱，这可能是由于膜上的电荷干扰了噬菌体颗粒的洗脱。

(2) 用 PCR 筛选噬菌体文库的最主要优点是在开始进行常规滤膜杂交之前，可使噬菌体文库的复杂性减少。一个文库的多块平皿可用这里描述的方法进行操作和筛选。例如，要筛选 100 万个噬菌斑，噬菌体按 50 000 pfu/皿接种，则共有 20 块平皿。用常规滤膜杂交进行筛选，要付出大量的时间和精力，用 PCR 筛选则在数小时内就可完成。再者，如把一阳性培养平皿上的琼脂切成八块进行新一轮 PCR，则可于大约 6250 pfu 重组噬菌体中筛选出阳性噬菌斑。这样一个规模的群体用常规滤膜杂交已较易实施。

(3) 在筛选一个文库之前，推荐从完整的文库中取出少量做一次 PCR。这有两个目的：其一，确证所期望的克隆存在于文库中，其二，确证所用的 PCR 条件能扩增出预期信号。操作时在 100 μL 的 PCR 系统中加入热变性的文库 5 μl。还可以对扩增片段进行测序，以证实扩增片段的正确性及 PCR 条件的特异性。这些工作可在 PCR 筛选文库之前或同时进行。

(4) 在开始筛选文库之前，要做的另一件有用的事情是估计文库中目的克隆的丰度。这可用 PCR 对不同稀释度，以及不经稀释的完整文库进行扩增（参见注释 3）而实现。例如目的克隆存在于含 20 000 个克隆的群体内，就不必按常规筛选 1 百万个克隆了。

(5) 不时地，PCR 可并无明显的原因而失败。为防止将这种偶然出现的“系统性的失败”当作阴性结果，在 PCR 中应设置对照。可以设置两种形式的对照：内对照和平行对照。对于内对照，可在扩增载体的 PCR 管中同时扩增引物，例如在克隆 λ 载体的文库中包括一段 λ 臂。或者，文库可以和一已知克隆及针对这一克隆的引物用在同一 PCR 中。如果内对照并不必需，可在平行的管中用 PCR 扩增一已知序列作为平行对照。

(6) 同时筛选多个基因时，在同一 PCR 内可加入多对引物，只要所期望的 PCR 产物因为长度不同而可在凝胶上彼此区分开来就行。这一方法最主要的局限性是在进行文库筛选之前必须有序列资料用以合成引物。在 PCR 筛选中以基于特定序列资料的非简并引物为最好。用简并引物寻找相关基因也可能是一种选择，尽管我们并未尝试这一方案。

(7) 因为含噬菌体的洗脱液可以贮存，同一批平皿也可用于同一基因或不同基因的多次筛选。

(8) 如果筛选一较小的片段，扩增数多于标准的 30 循环可能是有必要的。对于一个 200 bp的片段，我们扩增 35 个循环以取得足够浓度的 DNA，使在 3% 的琼脂糖凝胶上看到条带。

(9) 鉴于 PCR 的灵敏度，同一平皿上的文库可被多次筛选而不会丢失阳性信息。平皿也可于 4℃ 条件下存放数周以备再次印膜。无论是新鲜的或存放 3 周的平皿，我们曾用同一平皿印膜 5 次，而从噬菌体洗脱液获得良好扩增。对于噬菌体洗脱液也是如此，可在扩增前存放数周或更长的时间。

参 考 文 献

1. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis,T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual,* (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

第六部分
DNA 序列测定

第四十一章　应用 M13 噬菌体作为载体克隆 DNA 片段

Qingzhong Yu

1. 引　　言

噬菌体 M13 已发展成为取得单链 DNA 模板的载体克隆系统，它可用于双脱氧链终止法对 DNA 的测序[1,2]。用作克隆载体的 M13 的资料已在参考文献 3 中有详尽论述，M13 克隆中所用的外源性 DNA 片段（插入片段）的制备也已在第二十七、二十八章中进行过讨论，本章主要讨论 M13 载体的制备和如何将外源 DNA 片段插入到该载体系统中去。

2. 材　　料

2.1　复制型（RF）M13 DNA 的制备

1）L-肉汤培养基：1% bacto-胰蛋白胨，0.5% bacto-酵母浸出液，1% NaCl，高压灭菌。
2）M9 固体基本培养基：M9 盐（12.8 g $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$，3 g KH_2PO_4，0.5 g NaCl，1.0 g NH_4Cl），20 ml 20%葡萄糖，加水至 1 L，高压灭菌。
3）M13 噬菌体：挑取新近的转化细菌培养皿上的单个蓝色噬菌斑。
4）*E. coli* JM103 或 JM109：M9 基本琼脂平皿上长出的单个菌落。
5）溶液 I：50 mmol/L 葡萄糖，25 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，10 mmol/L EDTA、pH 8.0，高压灭菌后置 4℃ 中贮藏。
6）溶液 Ⅱ：0.2 mol/L NaOH，1% SDS。临用前加等体积的 0.4 mol/L NaOH 和 2% SDS 母液，混匀后使用。
7）溶液 Ⅲ：60 ml 5 mol/L 醋酸钾，11.5 ml 冰醋酸，28.5 ml 水，置 4℃ 保存，临用前放在冰上。
8）TE：10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，1 mmol/L EDTA，pH 8.0。
9）酚/氯仿：混合等体积 TE 饱和的酚（核酸级）和氯仿（AR 级），置深色玻璃瓶中 4℃ 保存。
10）氯仿：AR 级。
11）乙醇：100%乙醇，－20℃ 贮藏。
12）RNase：1 mg/ml 胰 RNase A（不含 DNase）。

2.2 M13 载体的制备

1）适当的限制酶：－20℃保存。
2）10×限制酶（RE）缓冲液：通常与限制酶由厂家一起提供。
3）3 mol/L 醋酸钠、pH 5.2，4℃保存。
4）小牛肠碱性磷酸酯酶（CIP）置4℃保存。
5）10×CIP 去磷酸缓冲液：500 mmol/L NaCl，100 mmol/L Tris-HCl，100 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L 二硫苏糖醇。
6）蛋白酶 K：母液 10 mg/ml，－20℃保存。
7）10% SDS。
8）0.5 mol/L EDTA、pH 8.0。
9）10×TBE：108 g Tris-碱，55 g 硼酸，9.5 g EDTA·$2H_2O$。加水至 1 L。
10）用 1×TBE 配制 0.8% 琼脂糖凝胶。

2.3 插入片段和 M13 载体的连接

1）T4 DNA 连接酶：－20℃贮存。
2）10×连接缓冲液：500 mmol/L Tris-HCl，100 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L 二硫苏糖醇。
3）10 mmol/L ATP：－20℃贮存。

3. 方　　法

有多种构建好的 M13 载体[1,4]由厂商提供，因此购买要比自行制备方便得多。但有时为了满足某一克隆目的，要求一个具有特殊克隆位点的 M13 载体则又当别论。

3.1 RF M13 DNA 的制备

1）将 M9 基本培养基平皿上划线接种的 M13 宿主细菌（如 JM103，JM109）的单菌落中的细胞接种在一 20 ml 灭菌培养管（通用管）中的 5 ml L 肉汤培养基中，在 37℃中的旋转式摇床上培养过夜（参见注释 1）。
2）吸取 50 μl 细菌培养物加到装有 2 ml L 肉汤培养基的 5 ml 管中，用灭菌牙签轻轻地接触转化平皿上的单个蓝色噬菌斑，将牙签末端置上述培养管中轻洗（参见注释 2），经感染的培养物在 37℃中的旋转式摇床上培养 4～5 h。
3）取 1.0～1.5 ml 培养物加入微型离心管中，以 12 000 *g* 在室温中离心 2 min。上清液转移至一新管中，注意不要搅动沉淀。M13 单链 DNA（ss-M13）也可由上清液制备（参见第四十三章）。
4）抽气除去所有剩余的上清液（参见注释 3）。加 100 μl 溶液 I，用吸管上下吹吸或通

过强力涡旋振荡以重新悬浮沉淀。室温放置5～10 min。

5）加 200 μl 溶液Ⅱ，盖紧管口，快速上下倒转 5 次混匀，但不要涡旋振荡。冰上放置 5 min。
6）加 150 μl 冰冷的溶液Ⅲ。在倒置状态轻轻地涡旋振荡 10 s，置冰上 5 min。
7）以 12 000 *g* 离心 5 min，将上清液转移到新管中。
8）加等体积的酚/氯仿，涡旋振荡 20～30 s 使其混匀，按步骤 7 离心，转移水相（上层）到一新管中。
9）加等体积的氯仿，涡旋振荡 20～30 s 以混匀。按步骤 7 离心，将水相上层转移到新管中。
10）加 2 倍体积的乙醇，涡旋振荡混匀，置室温 5 min。按步骤 7 离心，轻轻抽气除去上清液（参见注释 4）。
11）用 1 ml 70％乙醇洗涤沉淀，在不改变试管放置方向的状态下离心 2 min 以求不搅动沉淀。按步骤 10 除去上清液。空气中干燥 10 min。
12）加 20μl TE（pH 8.0）以溶解沉淀，TE 中含 RNase（20 μg/ml）以除去其中的 RNA。稍事涡旋振荡。

至此双链 RF M13 DNA 已制备完毕，可用于限制酶切分析。

3.2 M13 载体的制备

RF M13 DNA 必须用限制酶进行消化后经 CIP 去磷酸处理以减少载体连接时非重组分子的再环化以达到降低背景的目的。如果插入 DNA 片段可以通过两种不同的限制酶的作用而产生不同的黏性末端，那么可以制备双重酶切载体而无须去磷酸处理（参见注释 5）。

1）在下列反应体系中加入一种限制酶以消化 RF M13 DNA：10 μl RF M13 DNA（约 400 ng），3～5 倍过量的限制酶，2 μl 10×相应的缓冲液，加水达到总体积 20 μl。37℃中保温 2 h。
2）取 2 μl 反应物，在 0.8％ 琼脂糖凝胶上电泳以分析酶切消化的程度，用未经消化的 M13 DNA 作参照（参见注释 3）。如果消化不完全，加大限制酶的用量并继续保温。
3）完全消化后用酚/氯仿提取 M13 DNA，加 0.1 倍体积的 3 mol/L NaAc 和 2.5 倍体积的乙醇，在 －20℃中至少沉淀 1 h。
4）用微型离心机以 12 000 *g* 离心 10 min 以沉淀 DNA，用 70％ 乙醇洗涤沉淀，空气中干燥。用 20 μl TE 溶解沉淀。
5）在 20 μl 线性化的载体中加入：5 μl 10×CIP 缓冲液，1 U CIP，加水至 50 μl。37℃保温 30 min（参见注释 6）。
6）保温结束时将下述溶液加入反应体系中：2.5 μl 10％ SDS（终浓度 0.5％），0.5 μl 0.5 mol/L EDTA、pH 8.0（终浓度 5 mmol/L），0.5 μl 10 mg/ml 蛋白酶 K（终浓度 100 μg/ml）。56℃保温 30 min 使 CIP 失活（参见注释 7）。
7）将反应冷却至室温，酚/氯仿提取两次，再经氯仿提取一次（见 3.1 节，步骤 8 和

9)。加 0.1 倍体积的 3 mol/L NaAc、pH 7.0（参见注释 8），充分混匀，加 2.5 倍体积的乙醇。混匀，－20℃放置至少 1 h。

8）按步骤 4 回收 DNA。用 20 μl TE 溶解沉淀。至此已经为与插入片段的连接做好准备。

3.3 插入片段与 M13 载体的连接

1）依次加入下列各物进行连接：1 μl M13 载体（约 20 ng），1 μl 10 mmol/L ATP，1 μl 10×连接缓冲液，1～4 μl 插入片段 DNA（按摩尔量计超过 3～4 倍），对于黏性末端的连接，用 1 U T4 DNA 连接酶（参见注释 9），加水至 10 μl 总体积。同时做两个对照反应，一个对照中用水代替插入片段 DNA，另一个对照中则用适量的已成功地克隆在 M13 载体中的测试 DNA。14℃保温过夜。然后－20℃贮存，或直接用于转化。

2）连接后取 1 μl 连接反应物用 0.8% 琼脂糖进行凝胶电泳分析以检验连接是否成功（参见注释 10）。用同样量的 M13 载体和未作连接处理的插入片段 DNA 作为对照。

3）将 5 μl 连接好的样品转化进恰当的感受态 *E. coli* 株中，例如 JM103，或 JM109（参见第二十九和第三十章）。

4. 注　　释

(1) M9 基本培养基对带有 F′附加体的细菌如 JM103 或 JM109 具有选择作用。它们在 M9 基本培养基中只能缓慢地生长，4℃保存时存活时间不长。因此，最好每个月把保存的菌株在基本培养基平皿上划线培养以保存菌种，再从这些平皿接种 L-肉汤培养基。细菌的母株应当贮存在含有 15% 甘油的 L-肉汤培养基中，－70℃保存。

(2) 噬菌体 M13 能在转化平皿上层琼脂中扩散相当长的距离。因此，应挑取一个与相邻噬菌斑远远隔离的噬菌斑以避免交叉污染。要获得高产量的 RF M13 DNA，最好从新近转化的平皿上挑取噬菌斑。

(3) 因为 RF M13 DNA 保留在感染细菌的内部，而含有 ss-M13 DNA 的 M13 子代噬菌体则被释放到培养基中，所以移去剩余的上清液可以减少 ss-M13 DNA 的污染。即便如此，有时仍可能出现 ss-M13 DNA 污染，从而可能混淆限制酶消化结果的分析。因此用限制酶消化 RF M13 DNA 和凝胶电泳分析时不忘用未经消化的 DNA 作对照。由于 ss-M13 DNA 不能被限制酶消化，所以消化过的或未经消化的 DNA 的电泳带的移动并无不同。

(4) 在回收 M13 DNA 时，有时看不到 M13 DNA 沉淀。因此，有必要小心取出上清液后留下少量的液体（20～30 μl）以减少 DNA 的丢失。用 70% 乙醇洗涤和在空气中干燥时也要注意这一点。

(5) 双重消化的载体可产生不配对的黏性末端，因此几乎不会因载体的再环化而形成什么背景。如果两种限制酶的反应可在同一种缓冲液中进行，可同时用两种不同的酶消化 RF M13 DNA。为了检测消化片段的大小，建立两个反应体系，两种酶

分别反应便可彼此作为对照。RF M13 DNA 被完全消化后，接着按 3.2 节的步骤 3 和 4 步操作。最后沉淀溶解在 20 μl TE 中准备作连接用。如果两种限制酶不能同时使用，那么用一种酶消化后应按第 3.2 节步骤 3 和 4 重行沉淀 DNA，并将它重新悬浮在 10 μl TE 液中。接着用第二种酶消化，然后再按第一种酶消化后的相同步骤抽提。为了检验第二种酶的消化情况，用未经切割的 RF M13 DNA 进行平行的消化反应。

经双酶切去除的小片段如果重新连接到载体上便可能产生背景问题。如遇到这类问题，应对载体 DNA 作凝胶纯化（参见第二十八章）。

(6) 对于平末端或缩进的末端，应用 1 U /2 pmol 的 CIP 在 37℃ 保温 15 min 。然后加等量 CIP，55℃ 中继续保温 45 min。

(7) 活性 CIP 的存在会对以后的 M13 载体与插入 DNA 的连接产生抑制作用。上述方法以外的另一方法是在 5 mmol/L EDTA 中 70℃ 加热 10 min 使 CIP 失活，然后用酚/氯仿抽提。

(8) 由于在酸性 pH 条件下 EDTA 的浓度超过 5～10 mmol/L 时便从溶液中析出，因此乙醇沉淀时必须用 pH 7.0 的 3 mol/L NaAc 取代常用的 pH 5.2 的 3 mol/L NaAc。

(9) 平末端的连接效率低于黏性末端的连接效率。为了提高平末端连接效率，须要用较高浓度的插入 DNA 和 T4 DNA 连接酶，应用 5 U 连接酶进行平末端反应。

(10) 可用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳来检查 M13 载体与插入片段的连接情况，用未连接的 M13 及插入片段作对照。由于相对分子质量增加的缘故，M13 与插入片段连接后在胶上移动较慢，有时表现为弥散或不清晰的条带，这种条带指示连接的程度。

致　谢

作者感谢 D. Cavanagh 在本稿写作中所给予的帮助。

参 考 文 献

1. Messing, J. (1983) New M13 vectors for cloning. *Meth. Enzymol.* **101,** 20–79.
2. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74,** 5463–5467.
3. Messing, J. (1993) M13 cloning vehicles, in *DNA Sequencing Protocols, Methods in Molecular Biology,* vol. 23 (Griffin, H. G. and Griffin, A. M., eds.), Humana, Totowa, NJ, pp. 9–22.
4. Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33,** 103–119.

第四十二章　应用外切核酸酶Ⅲ制备有序缺失系列

Denise Clark，Steven Henikoff

1. 引　　言

分子遗传学中的一个重要操作是将克隆的 DNA 片段按顺序造成缺失。这一操作广泛用于 DNA 测序中。有序缺失也可用于对基因中具有重要功能的序列的描绘，例如转录所需的序列。应用有序缺失方法于测序工作的原理是使克隆在质粒载体上的一个片段的各个连续部分与载体上的测序引物位点相邻接。缺失是用大肠杆菌外切核酸酶Ⅲ(Exo Ⅲ)[1]单向消化 DNA 而形成。如果末端为平末端或 5′ 突出端，Exo Ⅲ通过切除 3′ 端核苷酸消化掉双链 DNA 的一个链。3′ 端的 4 个或更多碱基的突出则不能被 Exo Ⅲ消化。

这里介绍两种制备用于 Exo Ⅲ消化的模板的方法，扼要总结在图 42.1 中。方法Ⅰ从双链质粒 DNA 开始。用限制酶 A 和 B 消化 DNA，这里 A 产生接近靶序列的 5′突出端或平末端，B 产生接近引物位置的 3′突出端。线性 DNA 用 Exo Ⅲ消化，每一个时间点取一个消化产物样品，这样就得到一套所期望长度的缺失。方法Ⅱ[2]从噬菌体单链 DNA 开始。用一个引物和它复性使之形成一个具有切口的双链环，使它的 5′ 端接近插入片段，然后用 T4 DNA 聚合酶合成第二个链。

接着用 ExoⅢ消化带切口链的 3′ 端。剩下的尚未消化的单链用 S1 核酸酶消化。用低熔点凝胶电泳检查缺失反应效果，并从切下的凝胶片内分离出所需的缺失产物[3,4]。这一步的目的在于排除不含所需缺失的 DNA。在稀释的琼脂糖凝胶上用 Klenow DNA 聚合酶修复末端，并通过连接末端而环化。转化进大肠杆菌后，挑选适当克隆作测序用。

方法Ⅰ的优点是可从插入片段的两侧进行缺失，使得从单个质粒开始，就可以对插入片段的两个单链进行测序。不过载体上的多聚接头内的限制酶切位点并不总是能满足所需的多种独特位点的要求，在这一点上方法Ⅱ更具优越性，因为它不需要限制酶切位点。这也意味着用方法Ⅱ可使用通用的引物从任何固定的一点开始制备一个缺失系列。方法Ⅱ的缺点是对插入片段的两条链测序，就需要 DNA 片段以不同方向插入的两个克隆。不过两个方法可以联合应用，从一个亲本克隆对两条链进行测序，降低了对多个惟一限制酶切位点的需求。在设计测序方案时，要充分意识到虽然对方法Ⅰ来说单链或双链模板都是可行的，但方法Ⅱ惟有双链模板可用。理由是对多数噬粒载体来说，合成切口环第二条链的引物复性到插入片段中进行单链模板测序时的引物位点的另一侧。

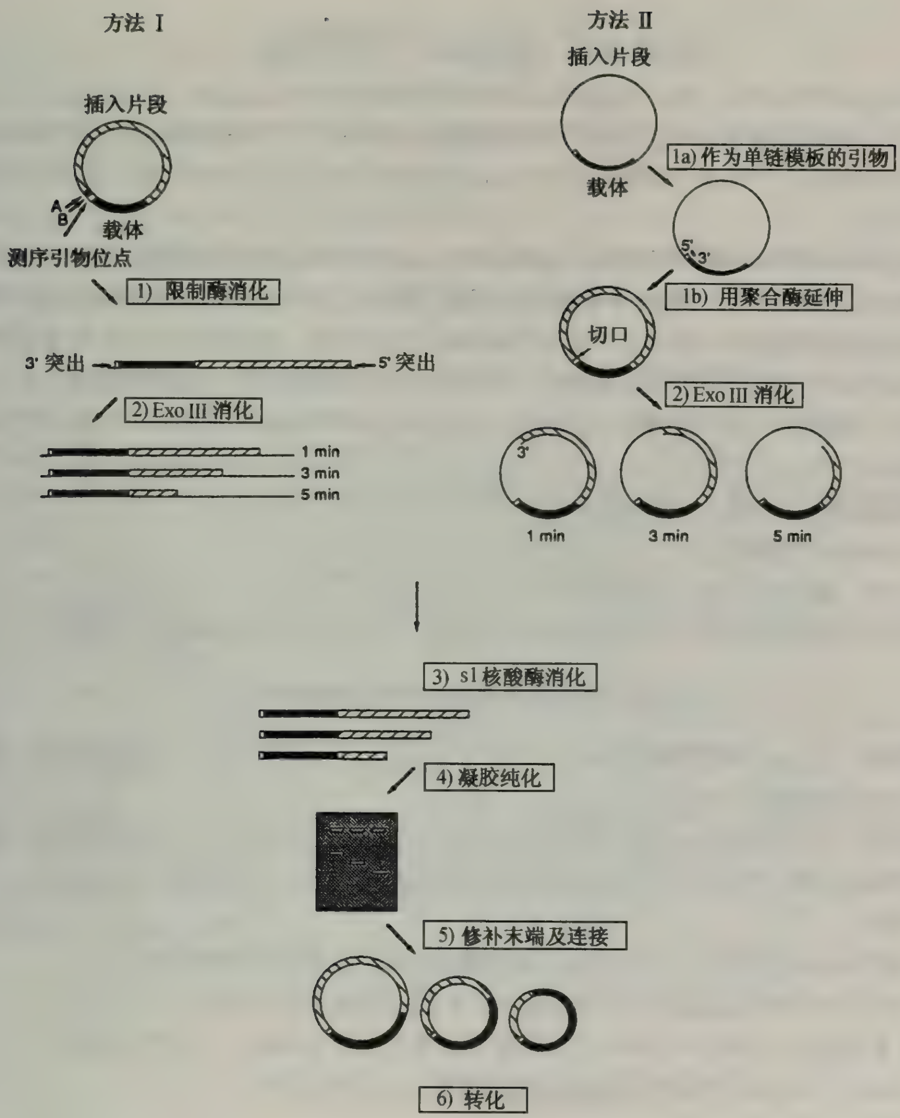


图 42.1 方法的提纲。

2. 材　　料

2.1 一般性问题

酶的缓冲溶液用经高压灭菌的蒸馏水配制。除非另有说明，溶液均在室温中贮存。酶的贮存按厂商要求。

2.1.1 方法 I：限制酶消化

1）10 μg 双链 DNA：DNA 应克隆在质粒或噬粒载体如 Bluescript（Stratagene，La Jolla，CA）的多克隆位点中。DNA 可用碱裂解方法制备[5]（参见注释 1）。在 10 ml 加适量选择药物（如氨苄青霉素）的 LB 培养液中培养过夜的细菌可提供足够量的 DNA。

2）限制酶及缓冲液由厂商提供。选择一种只在多克隆位点中邻近插入片段的部位切割质粒而产生 5′ 突出端或平末端的限制酶（图 42.1 中的 A）。限制酶 B 也必须切割多克隆部位的专一位点以产生 4 个碱基的 3′突出端，使线状 DNA 中最接近测序引物位点的末端不能被 Exo Ⅲ消化。如果得不到这样的位点，则可以制造一个 5′突出端，然后用 α-硫代磷酸 α-phosphorothionate 核苷酸通过 Klenow 片段的作用将末端补平[6]。

3）酚/氯仿：1∶1 混合，4℃保存。

4）10 mol/L 醋酸铵。

5）乙醇：95%和 70%（v/v）。

6）10×Exo Ⅲ 缓冲液：660 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，6.6 mmol/L $MgCl_2$。

2.1.2 方法Ⅱ：具切口的环状质粒的合成

7）模板：2.5 μg 单链噬粒 DNA，0.2～2.0 μg/μl。小规模（2～3 ml 培养物）制备应产生足够量的 DNA[5]。

8）引物：α-T3 20-mer（5′ CCCTTTAGTGAGGGTTAATT3′），或对等引物，例如反向杂交引物 17-mer（5′GAAACAGCTATGACCAT3′），浓度为 4 pmol/μl；-20℃保存。

9）T4 DNA 聚合酶：1～10 U/μl，从克隆或从经 T4 感染的细胞得到。

10）10×TM：660 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，30 mmol/L $MgCl_2$。

11）2.5 mmol/L dNTPs：四种三磷酸脱氧核苷各 2.5 mmol/L；-20℃保存。

12）BSA：1 mg/ml 牛血清白蛋白（无核酸酶），-20℃贮存。

2.2 Exo Ⅲ和 S1 核酸酶消化

13）*E. coli* Exo Ⅲ：150～200 U/μl（1 U=37℃中 30 min 产生 1 nmol 酸溶性核苷酸所需的酶量）。

14）S1 缓冲液浓缩物：2.5 mol/L NaCl，0.3 mol/L 醋酸钾（用 HCl 将 pH 滴定到 4.6，不要用醋酸），10 mmol/L $ZnSO_4$，50%（v/v）甘油。

15）S1 核酸酶：60 U/μl，从 Promega 购得（1 U=在 37℃中每分钟释放 1 μg 高氯酸可溶的核苷酸所需的酶量）。也可用 Mung bean 核酸酶。

16）S1 混合液：27 μl S1 缓冲液浓缩物，173 ml 水，1 μl（60 U）S1 核酸酶。临用前配制，冰上贮放。

17）S1 终止液：0.3 mol/L Tris 碱（无盐酸），50 mmol/L EDTA。

2.3　凝胶纯化，末端修复，连接和转化

18）琼脂糖：低熔点琼脂糖，适宜于作克隆用的级别，例如 Seaplaque GTG 琼脂糖 (FMC)。
19）溴化乙锭：10 mg/ml；保存在深色容器中。
20）50×TAE 电泳缓冲液：1 L 内含 242 g Tris 碱，57.1 ml 冰醋酸，100 ml 0.5 mol/L EDTA、pH 8.0。稀释后得到 1×缓冲液，内含 40 mmol/L Tris 醋酸，1 mmol/L EDTA。
21）10×上样缓冲液：0.25%溴酚蓝，50%甘油（v/v），蒸馏水配制。
22）10×Klenow 缓冲液：20 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，100 mmol/L $MgCl_2$。
23）Klenow 酶：*E. coli* DNA 聚合酶的大片段（2 U/μl）。-20℃保存。
24）Klenow 混合液：每 10 μl 10×Klenow 缓冲液中加 1 U Klenow 酶，临用前配制，冰上放置。
25）dNTPs：0.125 mmol/L 的每种脱氧核苷，-20℃保存。
26）10×连接酶缓冲液：0.5 mol/L Tris-HCl、pH 7.6，100 mmol/L $MgCl_2$，10 mmol/L ATP；-20℃保存。
27）PEG：50%（w/v）6000～8000 组分的聚乙烯乙二醇，4℃保存。
28）DTT：0.1 mol/L 二硫苏糖醇，-20℃保存。
29）T4 DNA 连接酶：(1 U/μl)，-20℃保存。
30）连接混合液：（1 ml）：570 μl H_2O，200 μl 连接酶缓冲液，200 μl PEG，20 μl 0.1 mol/L DTT，10 U T4 连接酶。临用前配制，冰上保存。
31）宿主大肠杆菌：感受态的 *rec*A^-细胞，例如 DH5α。
32）培养基：LB 培养基[5]。

3. 方　　法

3.1　Exo Ⅲ底物的制备

3.1.1　方法 I：限制酶消化

1）100 μl 体积中彻底消化 10 μg 质粒。在每一设定的酶切时间点，样品的消化中至少须用 200 ng 的质粒（参见注释 1）。
2）提取 DNA 时加 100 μl 酚/氯仿，涡旋振荡，将水相层转移到新管中。
3）加 25 μl 10 mol/L 醋酸铵和 200 μl 95%乙醇。置冰上 15 min，用微型离心机以 12 000 *g* 离心 5 min。
4）用 70%乙醇洗沉淀，空气中干燥。加 90 μl 蒸馏水和 10 μl 10×Exo Ⅲ 缓冲液 (100 ng/μl)重悬 DNA 沉淀。

3.1.2　方法Ⅱ：具切口的环状噬粒的合成

1）在 22 μl 体积中混合 2.5 μg 单链噬粒 DNA，4 μl 10×TM，1 μl（4 pmol）α-T3 引物

(或对等引物)。

2) 75℃中加热 5 min。然后在 30～60 min 内慢慢冷却。置铝制的试管加热块中加热，管上加盖一片绝缘的泡沫塑料以减少蒸发和浓缩。吸取 2 μl 以备作凝胶电泳分析。

3) 在 20 μl 体积中混合 2 μl DTT，4 μl 2.5 mmol/L dNTPs，4 μl BSA，5 U T4 DNA 聚合酶。

4) 预热到 37℃并在这温度中加入到结合有引物的 DNA 中，保温 2～8 h。图 42.2 所示是一个切口环的例子。当质粒为如此大小的分子时，作者建议 4～6 h 后在延伸反应物中再加 0.4 mmol/L dNTPs 和 0.1 U/μl 聚合酶，然后保温过夜。为了监测延伸反应效果，可取 0.5 μl 反应物加在凝胶上进行电泳。

5) 70℃加热 10 min 使聚合酶失活，然后在冰上贮存。

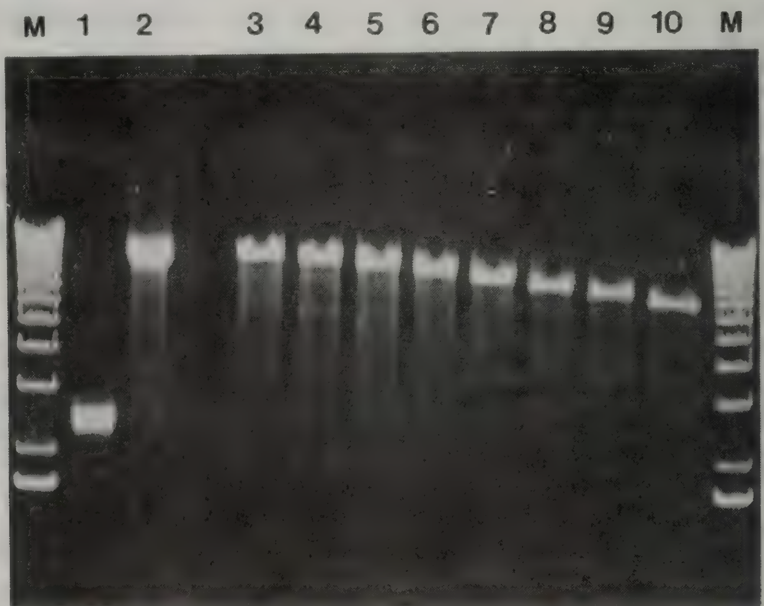


图 42.2　按方法Ⅱ制备的 DNA 缺失系列在低熔点琼脂糖凝胶上的电泳噬粒，大小为 9.5 kb。泳道 1：单链噬粒。泳道 2：具有切口的双链环经 T4 DNA 聚合酶过夜延伸。根据凝胶的状态，可能会偶尔看到在切口环的下方有一个不是主要的条带，它可能是以自身的 3′ 端作为引物的单链线状分子的延伸结果[2]。泳道 3～10：Exo Ⅱ对泳道 2 中的材料进行消化 1，2……8 min 的结果。泳道 M：1 kb 阶梯相对分子质量标准(BRL)，7 kb 条带与消化 8 min 的样品迁移到达同一位置上。

3.2　Exo Ⅲ酶消化

为要获得有一定程度重叠的连续序列，须要分离相隔 200～250 碱基的缺失。因此，4 kb插入片段的测序须用 16～20 个时间点（参见注释 2)。下述方法用于 16 个时间点。

1）配制 16 份 7.5 μl S1 核酸酶（参见注释 3)，冰上混合，每一时间点使用一份。

2）将 40 μl DNA 加到一个试管中（见 3.1.4. 或 3.2.5 节)，置加热块中将 DNA 升温到

37℃（参见注释 3）。加 1～2 μl Exo Ⅲ（5～10 U/μl），反复上下快速吹吸混匀。

3）每隔 30 s 取 2.5 μl 加到在冰上的预置有 S1 混合液的管中，用吸管上下吹吸，置于冰上直到全部时间点处理完毕。

4）从冰上取出全部样品，在室温中放置 30 min 。

5）加 1 μl S1 终止液，加热到 70℃，保温 10 min 使酶失活。

3.3 凝胶纯化，末端修复，连接和转化

1）每一样品中加 1 μl 10×凝胶上样缓冲液，上样到以 1×TAE 电泳缓冲液配制的、内含 0.5 μg/ml 溴化乙锭的 0.7% 低熔点琼脂糖的凝胶上，以 3～4 V/cm 电泳大约 2 h，直到各个时间点的缺失样品能够分开（参见注释 4）。在 300 nm 的紫外线光源照射下用一小药匙或解剖刀从胶上取出所要的条带。

2）加约 2 倍体积的蒸馏水稀释凝胶切片，68℃熔化 5 min。室温下将 1/3 稀释的 DNA 转移到一新管中，新管中盛有 0.1 倍体积的 Klenow 混合物，反复上下吹吸使混匀。37℃保温 3 min。加 0.1 倍体积 dNTPs 并混匀，37℃保温 5 min（参见注释 5）。

3）加等体积的连接混合物，混匀，室温中放置至少 1 h。如果连接反应保温过夜，可获最大量的转化子。

4）用每一连接物的一半转化 2～3 倍体积的在冰上解冻的感受态细胞，冰上放置 30 min，42℃热休克 90 s，37℃中用 0.2 ml LB 培养基后再保温 60 min。与适当的选择性培养基混合后倒入平皿中，37℃培养过夜。从每一样品所获菌落可达 500 个。这取决于连接反应进行的时间及细胞的感受态。－20℃贮存剩余的连接混合物。

5）在测序前从每一时间点取一个菌落建立培养物并抽提它的质粒 DNA，验证每一 DNA 样品所包含的缺失是否是所期望的大小。

4. 注　　释

（1）ExoⅢ在切口部位消化 DNA 就像在末端一样有效，因而形成非期望的克隆的背景。切口可因 DNA 中的杂质或由限制酶所引起。通过凝胶纯化能消除这种背景。经凝胶纯化后，质粒 DNA 可用标准的碱裂解法制备，其中包括酚/氯仿提取步骤[4]。如果证实切口确实是一个问题，可用 Qiagen Inc.（Chatsworth，CA）的预制柱纯化超螺旋 DNA。限制酶偶尔也会产生过多切口或出现“星号”活性。试用不同厂商的供货常常能够解决这一问题。

（2）37℃中 Exo Ⅲ每分钟消化 400～500 个碱基，在 30～40℃范围内，这速率直接与温度有关，大约为 10%/ 1℃[7]。建议选少数时间点，对 DNA 样品进行 Exo Ⅲ消化试验。这样做的理由有三：

a．如果采用方法 I 的话，便可以证实两种酶都进行了完全酶切（参见注释 4）。

b．对于一个特定批号的 Exo Ⅲ，可以得到精确的消化率。

c．可以肯定在 DNA 样品中不存在过多的切口（参见注释 3）。

（3）如果处理大批时间点样品，可不用微型离心管而用一种有盖的锥形底微量滴定板更

为有效。这种滴定板可用于 S1 核酸酶水解、凝胶切片的收集和稀释、连接、末端修补和转化。

(4) 偶尔可见到对 Exo Ⅲ不敏感的片段，这是酶 A 消化不完全的结果（图 42.1）。只要这种片段不是主要带型，对消化片段作凝胶分离时可以不考虑它的存在。相反地，也可能存在消化率较高的另一片段。这是酶 B 消化不完全，以及其后 Exo Ⅲ再从片段的两端进行消化的结果。同样地，如果它不是主要的产物，凝胶分离应当能解决这一问题。

(5) 代替胶内连接的另一个方法是将末端修补和连接合并为一个步骤。在 1 ml 混合液中含 560 μl 水、200 μl 连接缓冲液、200 μl PEG、20 μl DTT、各种 dNTPs 20 μl (2.5 mmol/L)、1 U T4 DNA 聚合酶和 10 U T4 DNA 连接酶。混合稀释凝胶片中的 DNA 的 1/3 和等量的连接混合液，室温保温 1 h 到过夜。依照 3.3 步骤 4 的方法进行转化。

参 考 文 献

1. Henikoff, S. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. *Gene* **28,** 351–359.
2. Henikoff, S. (1990) Ordered deletions for DNA sequencing and in vitro mutagenesis by polymerase extension and exonuclease III gapping of circular templates. *Nucleic Acids Res.* **18,** 2961–2966.
3. Nakayama, K. and Nakauchi, H. (1989) An improved method to make sequential deletion mutants for DNA sequencing. *Trends Genet.* **5,** 325.
4. Steggles, A. W. (1989) A rapid procedure for creating nested sets of deletions using mini-prep plasmid DNA samples. *Biotechniques* **7,** 241,242.
5. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
6. Putney, S. D., Benkovic, S. J., and Schimmel, P. R. (1981) A DNA fragment with an α-phosphorothioate nucleotide at one end is asymmetrically blocked from digestion by exonuclease III and can be replicated in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78,** 7350–7354.
7. Henikoff, S. (1987) Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analysis. *Meth. Enzymol.* **155,** 156–165.

第四十三章 M13 噬菌体生长和单链 DNA 制备

Fiona M. Tomley

1. 引 言

M13 细菌噬菌体具有一单链 DNA（ssDNA）基因组，已证实它是极为有用的载体，从中可以取得用于测序和定点诱变的单链模板。感染宿主细胞后，噬菌体 DNA 开始复制成为双链噬菌体 DNA 中间体，由此产生含有 ssDNA 噬菌体的颗粒。被感染的细胞并不裂解，相反地噬菌体颗粒却持续释放。不过，被 M13 噬菌体所感染的细胞具有较长的复制周期，这意味着在整个感染过程中生长较慢的细胞区域在未感染的大肠杆菌背景中呈现为半透明的噬菌斑[1]。M13 重组噬菌体克隆可从隔离得很好的噬菌斑取得，并用作 ssDNA 的来源。

本章介绍用于测序的 M13 ssDNA 微量制备方法。该方法有两个部分：从液体培养基中生长的细胞取得包装的颗粒，以及用酚法除去外壳蛋白[2,3]。如果具备过夜培养的宿主细菌，本方法可很容易同时用来纯化多种样品并且只需一天时间。

2. 材 料

1）适宜于细菌 M13 噬菌体繁殖的 *E.coli* 株菌。推荐菌株包括 JM101、JM103、JM107、JM109、TG1、TG2。
2）2×TY 肉汤：1%胰蛋白胨，1%酵母抽提物，100 mmol/L NaCl，以每管 50 ml 分装后高压灭菌。
3）容纳 1.5 ml 培养物的灭菌管，例如用一次性的 10 ml 的 Falcon 管或者通用的塑料或玻璃瓶以及 37℃ 中快速振荡用的旋转式摇床。
4）微型离心机和 1.5 ml 离心管。
5）PEG/NaCl：20%PEG，2.5 mol/L NaCl。每一次配制 100 ml，经过滤除菌后 4℃ 贮存。
6）TE：10 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA、pH 8.0。为方便起见，以 1 ml 量分装 1 mol/L Tris-HCl 和 100 mmol/L EDTA、pH 8.0，－20℃ 中贮存。需用时冻融，稀释到 100 ml，核实 pH 值，过滤后室温保存。
7）酚：以 100～500 ml 量分装较高级别的重蒸酚，－20℃ 中贮存。平衡时先加热到室温，然后 65℃ 中熔化，加羟基喹啉到浓度为 0.1%。在熔化的酚中，加等体积 0.5 mol/L Tris-HCl、pH 8.0，混合几分钟后使两相分开，取去上层（缓冲液）。用 0.1 mol/LTris-HCl、pH 8.0 重复抽提直到酚相达到 pH 7.8 左右。用 TE 抽提一

次，去除水相，将酚贮藏在深色瓶中，上加一层新配的 TE（100 ml 酚中约加 20 ml），4℃贮存。新鲜酚应每月配制一次。

8）氯仿：使用未经在空气中长时间曝露的高级别的氯仿。与异戊醇以 24:1 混合，盖紧瓶盖室温贮存。

9）3 mol/L 醋酸钠、pH 5.2：在水中溶解固体醋酸钠，用冰醋酸将 pH 值调整到 5.2，分装后高压灭菌，室温保存。

10）乙醇：为方便起见，盖紧瓶盖在 −20℃ 中保存。

3. 方　　法

1）将*E. coli* 宿主的新近划线接种的培养皿上的单个菌落接种到装有 10 ml 2×TY 培养液的 250 ml 锥形瓶中，置摇床上 37℃ 振荡培养过夜。

2）过夜培养物以 1:100 接种入 2×TY，以取得足够提供每一样品 1.5 ml 的新鲜培养物。在每一灭菌管中分装 1.5 ml 培养物供各个样品用。

3）用灭菌牙签小心接触一下分开的单个噬菌斑，在 1.5 ml 含有新接种的细菌的管中洗牙签末端（参见注释 1 和 2）。这样就从噬菌斑转移足够数量的感染细胞到新鲜培养物中。1.5 ml 的培养物在 37℃ 中剧烈振荡培养 4.5～5.5 h（参见注释 3 和 4）。

4）将培养物转移到 1.5 ml 微型离心管内，离心 5min。

5）将上清液转移入清洁管中，确保沉淀物不被搅动。每一管中加 200 μl PEG/NaCl，涡旋振荡混匀，置室温中至少 15 min。

6）用微型离心机离心 5 min 以沉淀噬菌体颗粒，用吸管移出含 PEG 的上清液，再次离心数秒钟。用尖嘴的滴管小心吸去噬菌体沉淀周围的全部痕量上清液（参见注解 5）。在管底应该可以见到噬菌体沉淀。

7）每一噬菌体沉淀中加入 100 μl TE，剧烈涡旋振荡以确保沉淀物得以悬浮，然后加 50 μl 酚并涡旋振荡，留置几分钟。再一次涡旋振荡，离心 2 min 将相层分开。

8）仔细将上面的水相层转移到一 1.5 ml 新管中，小心使所有在界面上的沉淀物留下。

9）加 50 μl 氯仿，涡旋振荡，离心 1 min 分开相层（参见注释 6）。

10）仔细将上层水相转移到 1.5 ml 新管中，加 0.1 体积的 3 mol/L 醋酸钠和 2.5 倍体积的无水乙醇以沉淀 DNA。

11）用微型离心机离心 5 min，通过抽气去除乙醇，注意不要搅动 DNA 沉淀，这一阶段的 DNA 沉淀往往只能隐约看到。加 200 μl 70% 乙醇，离心 2 min 后非常仔细地取出乙醇。然后在真空中干燥几分钟，或者将管敞开经蒸发干燥。

12）加 30 μl TE 溶解沉淀。在这一阶段可取出几微升（2～5 μl）在微型胶上作电泳以检查 DNA 的质量和产量（参见注释 7）。其余 DNA 于 −20℃ 保存备用。

4. 注　　释

（1）如果噬菌斑已被挑取并在平皿上以菌落状态再度生长时（例如由于须要通过杂交筛选插入片段），制备 ssDNA 用的培养物可通过下列方法取得：用牙签在菌落上轻轻

接触后洗入 1.5 ml 新鲜细胞悬液中。

(2) 一旦获得了噬菌斑，最好尽快地将噬菌体扩增并将 DNA 纯化。因为如果噬菌体在 4℃ 中贮存的话，噬菌斑污染的机会将增加，而且 DNA 质量将下降。

(3) 在 1.5 ml 管中不要生长过长时间，因为这将导致裂解细胞的增加，从而造成宿主 DNA 的污染，并增加突变噬菌体的出现概率。

(4) 培养温度不要超过 37℃，在这温度中虽然宿主细菌可生长，但 M13 噬菌体的产率将随温度的上升而明显下降。

(5) 确保去除全部 PEG，因为它将在测序中导致较高背景。

(6) 氯仿提取步骤可省略，但如果要获得最高质量的模板则不能省去这一步骤。

(7) 5～10 μg/ml 的 ssDNA 产量是正常的。如果最后的沉淀以 30 μl TE 溶解，约 4～8 μl已足够用于标准的双脱氧方法以获取高质量的测序结果。

参 考 文 献

1. Marvin, D. A. and Hohn, B. (1969) Filamentous bacterial viruses. *Bacteriol. Rev.* **33,** 172–209.
2. Bankier, A. and Barrell, B. G. (1983) Shotgun DNA sequencing, in *Techniques in the Life Sciences (Biochemistry), vol 85: Techniques in Nucleic Acid Biochemistry* (Flavell, R. A., ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 1–34.
3. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) Small-scale preparation of single-stranded bacteriophage M13 DNA, in *Molecular Closing, A Laboratory Manual.* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 4.29–4.30.

第四十四章　从噬粒载体制备 ssDNA

Michael K. Trower

1. 引　　言

制备单链 DNA 模板对于 DNA 测序及定向诱变具有重要的意义。通常情况下，进行该项工作是将要分析的 DNA 区域亚克隆到源出于单链 DNA 噬菌体的载体上，最普通的是 M13。不过，虽然这些载体适宜于产生 ssDNA，但它们使用起来不及质粒方便，比双链 DNA 产量低，且缺少可供正向选择的标记。称作噬粒（phagemid）的发明结合了质粒和噬菌体两者的优点，这项工作源出于 Zinder 的工作[1]，他证实当宿主细胞通过辅助噬菌体进行超感染时，带有 f1 丝状噬菌体的基因间区段的质粒可被包装成 ssDNA。可是第一代噬粒，即 pEMBL 载体的 ssDNA 产量低并且不可重复。这一难题通过两种主要方式得以解决：第一，在 f1 的基因间区段造成缺失可促进噬粒的复制[2]；第二，使用弱复制起点的辅助噬菌体可极大地改进噬粒与辅助噬菌体的包装比率[3]。由于上述的研究工作，具有稳定性以及便于从质粒 dsDNA 克隆载体取得大量 ssDNA 的新一代噬粒载体就此具备。

2. 材　　料

除非特别说明，溶液均在室温保存。

1）通过转化将噬粒引入含适当 F′附加体的 *E. coli* 宿主菌株，如实验室常用的菌株 JM109、NM522、TG1 或 XL1-Blue（参见注释 1～3）。

2）辅助噬菌体：M13K07 或 VCSM13。它们的典型滴度是 10^{11}～10^{12} pfu/ml。

3）TBG 培养基：配制 1 L，加 12 g 胰蛋白胨，24 g 酵母提取物，4 ml 甘油，以蒸馏水加至总体积 882 ml，高压灭菌。冷却后加 100 ml 灭菌的 0.17 mol/L KH_2PO_4 和 0.72 mol/L K_2HPO_4 溶液，18 ml 20％葡萄糖溶液（w/v）。20％的葡萄糖液应单独高压灭菌。

4）卡那霉素：加水配成 75 mg/ml 母液，－20℃保存。

5）PEG/NaCl 溶液：20％（w/v）聚乙烯乙二醇 6000 或 8000，2.5 mol/L NaCl。

6）TE 缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl（pH 7.4），1 mmol/L EDTA，高压灭菌。

7）酚：重蒸并加 TE 缓冲液到饱和，4℃贮存。

8）3 mol/L 醋酸钠，pH 5.2。

3. 方　　法

1）将新近划线培养得来的菌落接种到 2 ml TBG 培养液中。加入大约 10^7～10^8 pfu/ml

的 VCSM13 或 M13KO7 辅助噬菌体。这样得到的感染倍数（moi）为 10～20（参见注释 4 和 5）。如果质粒可用抗生素筛选，例如用氨苄青霉素（100 μg/ml），也应加入。37℃中强劲通风条件下培养 2 h。

2）加 2 μl 卡那霉素（75 mg/ml）后继续生长过夜，VCSM13、M13KO7 噬菌体都对于这一抗生素具有抗性。由于辅助噬菌体不会裂解被感染的细胞，过夜培养物应达饱和生长状态。

3）转移 1.4 ml 过夜培养物到 1.5 ml Eppendorf 管中，以 13 000 *g* 离心 5 min。将上清液倾入一新管中，注意不要倒进细胞。重新离心 5 min，并将此上清液再次倒入新管中。如果得到的 ssDNA 当时不能进一步处理，上清液可在 4℃中贮存 24 h，不过在继续操作前必须重新离心。沉淀可以丢弃。

4）加 200 μl PEG/NaCl 溶液，混合并在冰上放置 20 min，离心 5 min。这时管底应可见少量沉淀。丢弃上清液，以 13 000 *g* 重新离心 2 min。以微型吸管的吸嘴小心移去残存的 PEG/NaCl 溶液。

5）在 150 μl TE 缓冲液中重悬沉淀，加等体积 TE 饱和酚。涡旋振荡 10～15 s，试管放置 5 min。重新涡旋振荡后以 13 000 *g* 离心 3 min。再次取出上层至新管中。不必担心上层很浑浊，这些制备物中出现浑浊相当常见。

6）加 150 μl 氯仿，涡旋振荡 10～15 s，放置 5 min。重新涡旋振荡并离心 3 min，再次将上层转移到新管中。

7）加 15 μl 3 mol/L 醋酸钠（pH 4.8～5.2）和 300 μl 乙醇。将管放置干冰上 10 min 或 －20℃过夜。13 000 *g* 离心 10 min，倒掉液体，重新离心 2 min，用微型吸管的吸嘴取出残留液体，然后真空或空气中干燥。此时应当能见到少量沉淀。以 50 μl TE 或水溶解沉淀。如果不立即使用，－20℃保存。

ssDNA 产量通常约每毫升肉汤培养基 10 μg DNA。可在 1％琼脂糖凝胶上以少量提取物（2～5 μl）作电泳来鉴定所分离的模板质量及产量。用溴化乙锭染色可见两条带：辅助噬菌体 ssDNA 和噬粒 ssDNA。辅助噬菌体不应干扰测序反应和诱变反应。

4. 注　　释

（1）所用 *E. coli* 菌株必须含有 F′附加体，使辅助噬菌体能够感染宿主细胞。

（2）噬粒包括 pUC118/9[3]、pBluescript II（Stratagene）、pGEMZf（Promega）系列克隆载体。

（3）f1 复制起点的方向决定了辅助噬菌体感染后产生噬粒的是哪一条 DNA 链。一般把噬粒的两个链称为（＋）和（－），对于 pBluescript II 噬粒来讲，它们分别指从 *lac*Z 基因得来的有义链和反义链。在设计测序引物和诱变引物以确保它们能与获救的 ssDNA 模板相杂交方面，这种信息是至关重要的。

（4）moi 指辅助噬菌体和培养物中的细胞数的比率。例如，moi 为 10 时意味着 10 个辅助噬菌体对一个细菌细胞。一般情况下，moi 为 10～20 时可以得到高产量的 ssDNA。

（5）也可用 R408 辅助噬菌体，但在第 3 步中不加抗生素，因为 R408 不具卡那霉素抗

性。

致　谢

作者感谢剑桥大学医学系的 Sydney Brenner 所给我设计这一方法的机会，此外，这项工作还得到E. I. du Pont Nemours and Co. Inc.，Wilmington，DE. 奖学金的资助。

参 考 文 献

1. Dotto, G. P., Enea, V., and Zinder, N. D. (1981) Functional analysis of bacteriophage f1 intergenic region. *Virology* **114,** 463–473.
2. Zagursky, R. J. and Berman, M. L. (1984) Cloning vectors that yield high levels of single-stranded DNA for rapid DNA sequencing. *Gene* **27,** 183–191.
3. Vieira, J. and Messing, J. (1983) Production of single-stranded plasmid DNA. *Meth. Enzymol.* **153,** 3–11.

第四十五章　用于双脱氧测序的快速质粒纯化法

Annette M. Griffin, Hugh G. Griffin

1. 引　　言

双脱氧链终止法的 DNA 测序分析中包含从单链模板合成 DNA 这一步[1]。酶合成从寡核苷酸引物复性的位置开始。传统上，所测定的是由单链的 M13 噬菌体[2,3]或噬粒[4]所产生的模板序列。进行质粒测序具有无须将待测片段亚克隆进 M13 的优点，并且通过反向引物从同一质粒可测出两条链的序列。对于大多数目的，用手工操作[5]或自动测序仪[6]进行线性扩增（循环测序）可获得最为满意的结果。不过经变性的质粒 DNA 在手工操作的非扩增方法[7]中也可作为合适的 DNA 模板。特别重要的是当制备测序用的质粒 DNA 时应十分注意 DNA 分离和纯化的技术。大多数与质粒测序有关的问题出在模板的质量上。

用 CsCl-溴化乙锭梯度离心法制备的质粒 DNA[8]可用作测序的模板，但不一定比微量制备 DNA 方法得到的结果更好。有多种微量制备 DNA 方法可用来制备测序模板[9]。使用碱处理或煮沸（引物存在时）可达到变性的目的。对于线性扩增测序，事先变性并无必要，因为质粒在热循环过程中必被加热变性。

本章介绍一种微量制备方法，其中包含碱裂解法[10]，接着用 GeneClean®（一种纯化 DNA 的商品试剂盒）纯化 DNA。GeneClean 试剂盒依据的是 DNA 能与二氧化硅基质结合而 DNA 污染物则不结合的原理，后者经反复洗涤便可从二氧化硅-DNA 结合物上除去[11]。所取得的 DNA 可直接用作循环测序的模板或经碱变性后用于测序酶 DNA 聚合酶 Version 2.0 测序。

2. 材　　料

2.1 DNA 制备

1) GET 缓冲液：50 mmol/L 葡萄糖，10 mmol/L EDTA，25 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0。配成的溶液应以 10 lb/in^2（68.9 kPa）高压灭菌 15 min 后 4℃保存。
2) 溶菌酶缓冲液：在 GET 缓冲液中以每毫升 20 mg 溶菌酶新鲜配制。
3) 碱性 SDS：200 mmol/L NaOH，1% SDS。按下列成分新鲜配制：200 μl 5 mol/L NaOH，500 μl 10% SDS，加 4.3 ml 水。
4) 3 mol/L 醋酸钠、pH 4.8。用冰醋酸将 pH 值调节到 4.8。
5) 酚/氯仿：由等量的酚和氯仿配成。混合物也可用 0.1 mol/L Tris-HCl（pH 7.6）

平衡几次，但这并非必要。

2.2 DNA 纯化（使用 GeneClean-II 试剂盒）

6）GeneClean-II 试剂盒可从 BIO 101 Inc.（La Jolla，CA），或从 Stratech Scientific（Luton，Bedfordshire，England）购得。此外，也可以自行配制（参见第二十八章）。

2.3 碱变性

7）100%乙醇。
8）70%乙醇。

2.4 引物复性

9）质粒反应缓冲液：（5×浓缩）200 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，100 mmol/L $MgCl_2$，250 mmol/L NaCl。
10）引物：0.5 pmol/μl。

3. 方　　法

3.1 DNA 制备

1）5 ml 肉汤过夜培养物以 12 000 *g* 离心 5 min（参见注释 1）收集细胞。
2）在 100 μl 溶菌酶缓冲液中重悬沉淀并转移到新的 1.5 ml 微型离心管中，然后冰上放置 30 min（参见注释 2～5）。
3）加 200 μl 碱性 SDS，涡旋振荡，然后冰上放置 5 min。
4）加 150 μl 3 mol/L 醋酸钠、pH 4.8，涡旋振荡后冰上放置 20 min。
5）在微型离心机中以 12 000 *g* 离心 10 min，吸取 0.4 ml 上清液转移到一新管中。
6）用等体积酚/氯仿抽提两次。

3.2 DNA 纯化（用 GeneClean-II 试剂盒）

1）从 GeneClean-II 试剂盒取 3 倍体积的 NaI 母液加到酚/氯仿抽提过的微量制备物中（参见注释 6、7）。如有必要，可用 2 ml 微量离心管。
2）从 GeneClean-II 试剂盒取 5 μl GLASSMILK 悬液，加入后混合，室温放置 5 min。
3）微型离心机中离心 5 s。
4）移去上清液，用 GeneClean-II 试剂盒的 NEW WASH 洗沉淀三次。
5）小心地从沉淀中移去最后的痕量 NEW WASH。
6）将 DNA 洗脱在 100 μl 水中。

3.3 碱 变 性

碱变性对热循环测序不是必需的。

1）取 86 μl 纯化的 DNA，加 4 μl 5 mol/L NaOH 和 10 μl 2 mmol/L EDTA，37℃ 保温 30 min（参见注释 8）。

2）用 10 μl 3 mol/L 醋酸钠（pH 4.8）中和。

3）用 2 倍体积 100％乙醇在 −70℃ 沉淀 15 min。

4）用微型离心机离心 2 min 以沉淀 DNA。

5）用 70％乙醇洗涤沉淀。

6）真空中干燥，用 7 μl 水重新溶解沉淀。

3.4 引物-模板复性反应

这一步骤对热循环测序并非必需。

1）在小的微型离心管内建立下述反应：1 μl 引物（0.5 pmol/μl），2 μl 5× 质粒反应缓冲液，和 7 μl 变性的质粒 DNA（参见注释 9）。

2）置 65℃ 水浴中 2 min，在大约 30 min 内缓慢冷却到 30℃，放置冰上（参见注释 10）。

3）如同在四十六章所描述的那样，用测序酶 Version 2.0 T7 DNA 聚合酶测序。热循环测序按文献（五，六，九和五十章）进行（参见注释 11、12）。

4. 注　　释

(1) 重要的是在细菌培养物离心后要从细胞沉淀中去除全部肉汤培养基上清液。

(2) 重要的是要确保细菌沉淀能在溶菌酶缓冲液中彻底重悬。剧烈地涡旋振荡可达此目的。

(3) 某些作者指出用碱裂解作微量制备时不须加溶菌酶[8]。我们认为虽然溶菌酶不是必要的成分，但使用溶菌酶后可裂解得更好。

(4) 在本方法中 RNase 处理不是必需的。

(5) 本方法适用于 pUC 系列高拷贝数质粒[12]及其衍生物。如果用低拷贝质粒（例如 pBR322 及其衍生物），则可能须要放大反应规模以获取同样量的质粒 DNA。

(6) 微量制备质粒 DNA 常常受到小的寡脱氧核苷酸及核糖核苷酸的污染，它们可能作为引物而在凝胶上形成微弱的背景带或终止物以及其他矫作物。DNA 聚合酶的抑制物也可能存在。按照作者的经验，用 GeneClean 的方法纯化 DNA，并结合使用测序酶 DNA 聚合酶 Version 2.0 测序，可减少上述麻烦。

(7) 其他的商品试剂盒例如 US Bioclean（可从 United States Biochemical Corp.［Cleveland, OH］或从 Amersham Life Science［Little Chalfont, England］等处购得），或用非商品试剂的实验方法依据 GeneClean 相似的原理[9,11]自制，也能获满意结果。

(8) 双链超螺旋 DNA 最好用碱变性法变性。煮沸法可以成功地将线性 DNA 变性（有引物存在时）。
(9) 用测序酶 DNA 聚合酶对质粒 DNA 测序时，DNA 模板略微过量是有帮助的。一般用 5 μg。
(10) 复性反应混合物于 37℃ 加热 15～30 min 可同样达到复性目的。
(11) 对变性的双链 DNA 作测序时，用较长引物（25～29 个核苷酸）可能有助于减少矫作物条带。
(12) 测序酶 DNA 聚合酶 Version 2.0 用于双链 DNA 测序效果良好。

参 考 文 献

1. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74,** 5463–5467.
2. Messing, J., Gronenborn, B., Müller-Hill, B., and Hofschneider, P. H. (1977) Filamentous coliphage M13 as a cloning vehicle: insertion of a *Hin*dIII fragment of the *lac* regulatory region in M13 replicative form *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74,** 3642–3646.
3. Messing, J. (1983) New M13 vectors for cloning. *Meth. Enzymol.* **101,** 20–78.
4. Zagursky, R. J. and Berman, M. L. (1984) Cloning vectors that yield high levels of single-stranded DNA for rapid DNA sequencing. *Gene* **27,** 183–191.
5. Blakesley, R. W. (1993) Cycle sequencing, in *DNA Sequencing Protocols. Methods in Molecular Biology Series,* vol. 23 (Griffin, H. G. and Griffin, A. M., eds.), Humana, Totowa, NJ, pp. 209–217.
6. Rosenthal, A. and Jones, D. S. C. (1993) Linear amplification sequencing with dye terminators, in *DNA Sequencing Protocols. Methods in Molecular Biology Series,* vol. 23 (Griffin, H. G. and Griffin, A. M., eds.), Humana, Totowa, NJ, pp. 281–296.
7. Griffin, H. G. and Griffin, A. M. (1993) Plasmid sequencing, in *DNA Sequencing Protocols. Methods in Molecular Biology Series,* vol. 23 (Griffin, H. G. and Griffin, A. M., eds.), Humana, Totowa, NJ, pp. 131–135.
8. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
9. Griffin, H. G. and Griffin, A. M., eds. (1993) *DNA Sequencing Protocols. Methods in Molecular Biology,* vol. 23, Humana, Totowa, NJ.
10. Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7,** 1513–1523.
11. Vogelstein, B. and Gillespie, D. (1979) Preparation and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76,** 615–619.
12. Vieira, J. and Messing, J. (1982) The pUC plasmids, an M13 mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene* **19,** 259–268.

第四十六章　应用测序酶 Version 2.0 T7 DNA 聚合酶进行 DNA 测序

Carl W. Fuller, Bernard F. McArdle,
Annette M. Griffin, Hugh G. Griffin

1. 引　　言

双脱氧链-终止法 DNA 测序中包括在 DNA 聚合酶作用下从特异引物延伸的一条 DNA 链的合成[1]，为达到此目的，有几种不同的酶可供选用，每一种有不同的性质和特点。

噬菌体 T7 DNA 聚合酶是由两个亚单位组成的一种蛋白质[2,4]。较小的亚单位，硫氧还蛋白（相对分子质量 12 000）为*E. coli* 的*trx* A 基因产物，较大的亚单位（相对分子质量 80 000）是 T7 基因 5 的产物。这一聚合酶有两个已知催化活性，即依赖于 DNA 的 DNA 聚合酶活性和可对单链及双链 DNA 都起作用的 3′→5′外切酶活性。外切酶活力是如此之高，以至于该酶不适于作测序用。Tabor 和 Richardson[5,6]报道一种使外切酶氧化失活而几乎不影响聚合酶活性的方法[7,8]。这种经化学方法改造的 T7 DNA 聚合酶在商业上称 Sequenace™ Version 1.0 T7 DNA 聚合酶。此外还有用基因工程方法制造的、在催化亚单位外切酶结构域内少了 28 个氨基酸的 T7 DNA 聚合酶[9,10]。这种酶具有极佳的 DNA 测序性能，商品名称为测序酶 Version 2.0 T7 DNA 聚合酶。

经化学改造和通过基因工程方法得到的酶具有相似的特征和相似的使用方法[5,11]。这里只讨论测序酶 Version 2.0 T7 DNA 聚合酶的使用方法和结果。

1.1　经改造的 T7 DNA 聚合酶的性质

所用方法和 DNA 测序实验结果取决于 DNA 聚合酶的活力和特性，包括酶的催化速度和推进能力，包括对结合在模板上的链的排斥和读通模板的二级结构的能力以及利用核苷酸类似物作底物的能力。低外切核酸酶活力的 T7 DNA 聚合酶与天然的高外切酶活力的酶不一样，具有较强的链置换活力[9,12]，使经改造的 T7 DNA 酶具有能够对二级结构测序的能力。

经改造的 T7 DNA 具有快速的催化活力（300 个/s）和较高的加工进度，能与引物-模板相结合而催化成百上千的核苷酸的聚合物而不解离[5]，这一特点有助于消除对读序带来干扰的背景终止。

目前所经常进行的 DNA 测序广泛采用核苷酸类似物做标记，以使压缩的条带分开并用于链的终止。利用 α-硫代 dNTPs 进行的 α-^{35}S 标记的掺入率基本上与正常 dNTPs 掺入率相等[7,12]。同样地，用于消除测序胶中压缩矫作物的 dGTP 类似物（包括 7-

deaza-dGTP 和 dITP）可通过经改造的 T7 DNA 聚合酶的作用而被有效地掺入[7,13]。在各种用于测序的 DNA 聚合酶中，要求最低的双脱氧核苷酸和脱氧核苷酸比率，意味着这类链终止核苷酸有较强的活力。在使用染料标记的核苷酸终止物荧光测序时，它可以同样地取得较好的结果[14]。

末端标记的一个重要方面是由于因测序条带强度差异而表现出终止速率的差异。由经改造的 T7 DNA 聚合酶得到的条带强度在约 4 倍范围内作较小的变化。与之相比，用 Klenow 酶在测序胶上形成的条带强度的变化范围高达 14 倍[7,15,18]。Tabor 和 Richardson 报道的是在电泳时用 Mn^{2+} 代替 Mg^{2+}（或者外加 Mn^{2+}）的观察结果[15,16]。经改造的 T7 DNA 聚合酶用 Mn^{2+} 时，须用较低的双脱氧核苷酸和脱氧核苷酸比率，较加 Mg^{2+} 时所形成的条带明显地更为均匀[16,17]。在有 Mn^{2+} 的情况下，超过 95% 的条带位于平均强度的 10% 范围内。条带强度的均一性改进了机器读序结果的解释[16,19,20]。经改造的 T7 DNA 聚合酶加 Mn^{2+} 可用于采用荧光标记的引物或特别设计的荧光双脱氧终端标记以取得测序数据[14,20]。

1.2 测序中焦磷酸酶的应用

包括 T7 DNA 聚合酶在内的所有的 DNA 聚合酶都能催化焦磷酸盐的分解[21,22]。焦磷酸盐水解作用是聚合作用的逆反应，其中 DNA 的 3′端碱基和焦磷酸反应形成脱氧核苷三磷酸，使 DNA 分子缩短一个碱基。在通常用于合成 DNA 的情况下（即较高的 dNTP 浓度和较低的焦磷酸盐浓度），正向反应（聚合反应）明显超过逆向反应（焦磷酸盐水解反应）。不过如果给予足够的时间，焦磷酸盐水解作用确实在某些条件下发生[7]（特别当 dITP 取代 dGTP 时）。焦磷酸盐水解作用速度随相邻序列的变化而变化，因而减弱某些条带的强度而不改变另一些条带[12,21,22]。DNA 测序反应中加无机焦磷酸酶（来自酵母菌）可稳定全部条带的强度，即使在保温时间为 60 min 并用 dITP 取代 dGTP 情况下。加焦磷酸酶对所有的 T7 DNA 测序方案是有益的或者至少无害。

1.3 DNA 测序反应中的甘油

在几种情况中在测序反应中加入 5% 或稍大量的甘油有利于测序的进行。最简单的例子是在 DNA 聚合酶的应用，聚合酶贮存液中的甘油可采用某一浓度而在使用时不须稀释。此外，加入 5%～20% 的甘油可使反应在提高温度的情况下顺利地进行，而且可以改善测序结果。例如，标记反应的温度可提高到 37℃ 而没有明显的酶活力丧失，却进一步增加了引物复性的严格性[23]。而且终止反应可在加甘油的条件下用较高的温度（37～50℃）和在较长时间（10～30 min）内进行。较高温度下聚合反应可以更迅速，而且温度超过 45℃ 时可消除某些模板的二级结构的干扰（参见注释 1）。

1.4 耐甘油的测序胶

加入到 DNA 测序凝胶中的样品中的甘油（一般每一泳道 25 μg 或稍多）可引起条

带形状的明显扭曲及间距的变化[7,24]。这种扭曲大约出现在离引物300～500个碱基处，使得测序结果难以阅读。这种现象值得注意是因为甘油被广泛用于酶的保存中，例如用于DNA测序的DNA聚合酶的保存。已知甘油与硼酸反应形成在测序胶上移动的带电复合物[25]。TBE中的硼酸被不与甘油反应的弱酸取代时便不出现扭曲条带。牛磺酸是硼酸较好的替代物。以20倍浓缩的Tris-牛磺酸-EDTA很容易配制，可用在一般的测序胶中取代常用的TBE（5～10倍浓缩物）[23]。

1.5 模板和引物的复性

链终止测序方法最初应用单链DNA模板。使用噬菌体M13作为克隆载体可以满足这一需要。单链噬菌体DNA只须与寡聚核苷酸引物混合后在37～70℃作短暂复性。假如双链DNA用作测序模板的话，首先须对模板作变性处理。早期虽有几种质粒DNA测序的方法，但在碱变性方法问世前没有一种方法是令人满意的[26~31]。最初的碱变性方法包括4步：DNA与碱混合，用浓醋酸盐缓冲液中和，用乙醇沉淀，用反应缓冲液重新溶解DNA。沉淀步骤起到两种作用：浓缩DNA和将先前加入的盐与DNA分离。对产生适用于测序的单链模板来说，这些步骤效果相当不错，但沉淀及重新溶解步骤既费时又费力。

这里介绍两种简便而有效的不须沉淀质粒DNA的变性方法。在第一种方法中，直接将NaOH加到含纯化的质粒DNA和引物的混合物中使双链DNA变性[32]。37℃中作短暂保温后准确量取等摩尔的盐酸加到混合物中以中和其中的碱。然后加浓缩缓冲液（pH固定在一适当的值），混合物作短暂保温以使引物和模板中适当的序列复性。NaOH和HCl化合形成了NaCl，成为DNA测序混合物的一个常规成分。只要NaCl浓度保持在大约低于0.2 mol/L以下，聚合酶便有较好活力并可获得高质量的测序结果。

在第二种方法中，双链质粒DNA和引物中加进乙二醇试剂（50%甘油，50%乙二醇）使乙二醇终浓度接近40%。这一浓度足以降低多数质粒的解链温度到<90℃。混合物于90～100℃保温5 min使质粒变性。变性后加缓冲液，37℃短暂保温以使引物与模板的适当序列复性。这种方法须用耐甘油的测序凝胶[33]；（参见注释1）。

1.6 两步反应法

模板和引物复性后聚合酶常同时用于标记测序产物及序列专一的终止反应。用经改造的T7 DNA聚合酶测序的最常用的方法由两个连续步骤组成：标记步骤和终止步骤[7,18]。这种方法与Sanger最初所用的方法不同。其中标记和终止在一次反应中完成，而且需要一个“追加”步骤以减少背景的出现[1]。

在标记步骤中，用限量的核苷三磷酸延伸引物，其中包括一种放射性标记的dNTP。反应液中的多数核苷酸，包括标记的核苷酸，被掺入到较短的DNA链中（小于50个核苷酸）。这样，标记物便高效和定量地掺入DNA链中。（如果使用标记引物，则上述标记步骤可完全省略）。取四等份的标记过的反应物加入到终止反应管中以启动终止反应。终止反应管中预先加有全部三磷酸脱氧核苷和四种三磷酸双脱氧核苷中的一

种。控制核苷酸的温度和浓度使聚合反应迅速并连续地进行，以便取得最低背景的测序结果并且使用最短的反应时间。加甲酰胺和 EDTA 以终止反应，加热变性，上样到电泳胶上。

2. 材　　料

2.1 模板和引物的复性

1）反应缓冲液（5×浓缩）：200 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，100 mmol/L $MgCl_2$，250 mmol/L NaCl。

2）引物：0.5～2.5 pmol/μl。

2.2 标记步骤

3）T7 DNA 聚合酶，用化学方法或遗传工程方法改造过的酶[12,18]，浓度调整到 13 U/μl 或约 1.0 mg/ml。

4）酵母无机焦磷酸酶，用 10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，0.1 mmol/L EDTA，50％甘油配成 5 U/ml 溶液。注意：焦磷酸酶可和经改造的 T7 DNA 聚合酶预先混合，其比率为 0.004 U 焦磷酸酶∶3 U 的聚合酶。（在 25℃ 中 1 U 焦磷酸酶每分钟水解 1 μmol/L 的焦磷酸盐）。

5）酶稀释用缓冲液：10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，5 mmol/L DTT，0.5 mg/ml BSA。

6）甘油－酶稀释用缓冲液：20 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，2 mmol/L DTT，0.1 mmol/LEDTA，50％甘油。可用来保持较高浓度的甘油（见 1.3 节）。

7）DTT 溶液：0.1 mol/L。

8）标记 dATP：可以是［α-^{32}P］-dATP、［α-^{33}P］-dATP 或［α-^{35}S］-dATP，用于序列的放射自显影检测。^{35}S、^{32}P 或^{33}P 的比活应为 1000～1500 Ci/mmol。

9）用于标记的 dATP 的标记混合物（dGTP 反应）：1.5 μmol/L dGTP，1.5 μmol/L dCTP 和 1.5 μmol/L dTTP（参见注释 2）。

2.3 终止步骤

10）ddG 终止混合液：80 μmol/L dGTP（或 7-deaza-dGTP），80 μmol/L dATP，80 μmol/L dCTP，80 μmol/L dTTP，8 μmol/L ddGTP，50 mmol/L NaCl。

11）ddA 终止混合液：80 μmol/L dGTP（或 7-deaza-dGTP），80 μmol/L dATP，80 μmol/L dCTP，80 μmol/L dTTP，8 μmol/L ddATP，50 mmol/L NaCl。

12）ddT 终止混合液：80 μmol/L dGTP（7-deaza-dGTP），80 μmol/LdATP，80 μmol/L dCTP，80 μmol/L dTTP，8 μmol/L ddTTP，50 mmol/L NaCl。

13）ddC 终止混合液：80 μmol/L dGTP（7-deaza-dGTP），80 μmol/L dATP，80 μmol/L dCTP，80 μmol/L dTTP，8 μmol/L ddCTP，50 mmol/L NaCl。

14）终止液：95%甲酰胺，20 mmol/L EDTA，0.05%溴酚蓝，0.05%二甲苯青 FF。

2.4 质粒 DNA 测序

15）质粒反应缓冲液（5×浓缩）：200 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，100 mmol/L $MgCl_2$，250 mmol/L NaCl。
16）NaOH 溶液：1.00±0.03 mol/L（必须精确）。
17）HCl 溶液：1.00±0.03 mol/L（必须精确）。
18）质粒变性试剂：10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，1 mmol/L EDTA，50%甘油，50%乙二醇。
19）20×耐甘油凝胶缓冲液：1.78 mol/L Tris，0.58 mol/L 牛磺酸，0.01 mol/L $Na_2EDTA \cdot 2H_2O$。

2.5 增进接近引物的条带的强度

20）Mn 缓冲液：0.15 mol/L 异柠檬酸钠，0.1 mol/L $MnCl_2$。

2.6 离引物 400 个碱基之外的测序

21）测序延伸混合物（dGTP 反应用）：180 μmol/L dGTP，180 μmol/L dATP，180 μmol/L dCTP，180 μmol/L dTTP，50 mmol/L NaCl。

2.7 压　　缩

22）用于标记的 dATP 的标记混合液（7-deaza-dGTP 反应）：1.5 μmol/L 7-deaza-dGTP，1.5 μmol/L dTTP，1.5 μmol/L dCTP；（dITP 反应）：3.0 μmol/L dITP，1.5 μmol/L dCTP，1.5 μmol/L dTTP。

dITP 反应的终止混合液：
23）ddG 终止混合液：160 μmol/L dITP，80 μmol/L dATP，80 μmol/L dCTP，80 μmol/L dTTP，1.6 μmol/L ddGTP，50 mmol/L NaCl。
24）ddA 终止混合液：160 μmol/L dITP，80 μmol/L dATP，80 μmol/L dCTP，80 μmol/L dTTP，8 μmol/L ddATP，50 mmol/L NaCl。
25）ddT 终止混合液：160 μmol/L dITP，80 μmol/L dATP，80 μmol/L dCTP，80 μmol/L dTTP，8 μmol/L ddTTP，50 mmol/L NaCl。
26）ddC 终止混合液：160 μmol/L dITP，80 μmol/L dATP，80 μmol/L dCTP，80 μmol/L dTTP，8 μmol/L ddCTP，50 mmol/L NaCl。
27）测序延伸混合液（dITP 反应用）：360 μmol/L dITP，180 μmol/L dATP，180 μmol/L dCTP，180 μmol/L dTTP，50 mmol/L NaCl。

3. 方　　法

3.1　模板和引物的复性

每组四条测序泳道（以及其后的标记反应）只用一次复性反应。有关质粒 DNA 模板的变性和测序见 3.4 节。

1）离心管内加入下述液体：1 μl 引物（0.5 pmol），2 μl 反应缓冲液，1 μg DNA（如用 dsDNA，须经变性处理），加 7 μl ddH_2O 至终体积 10 μl。
2）盖住离心管后 65℃ 加热 2 min，然后缓慢冷却至室温（大约需 30 min）。
3）复性后将管放置冰上，4 h 内使用。

3.2　标 记 步 骤

1）用酶的稀释缓冲液稀释经改造的 T7 DNA 聚合酶至工作浓度（1.6 U/μl）。
2）在经复性的模板-引物中（在冰上）加入下述溶液：10 μl 模板-引物，1 μl DTT（0.1 mol/L），2 μl 标记混合液，0.5 μl [α-^{35}S] -dATP（参见注释 3），2 μl 稀释的酶（酶总是最后加入）。总体积 15.5 μl。
3）充分混合后室温中放置 2～5 min（参见注释 4）。

3.3　终 止 步 骤

步骤 1 和 2 最好在开始标记反应前做完。

1）取四支试管标记 G、A、T 和 C。
2）G 管内加 2.5 μl ddGTP 终止混合液。同样地，将 2.5 μl ddATP、ddTTP 和 ddCTP 终止混合液分别加入 A、T 和 C 管。盖紧管口以防蒸发。
3）加标记反应液前至少 37℃ 预热试管 1 min。
4）标记反应完成后，取 3.5 μl 反应物加到 G 管中，37℃ 继续保温 G 管。同样地，取反应物 3.5 μl 分别加到 A、C 和 T 管中，将它们返还 37℃ 水浴中。继续保温，总时间为 3～5 min。
5）加 4 μl 终止液到每一反应物内，充分混合，放置冰上保存直到准备上样到电泳凝胶上时为止。用 ^{35}S 标记的样品可在 －20℃ 保存一周几乎没有损坏。用 ^{32}P 标记的样品应在当天上样。
6）准备好凝胶后将样品 75～80℃ 加热 2 min 后立即上样。每一泳道加 2～4 μl。

3.4　质粒 DNA 的测序

要得到最佳测序结果，重要的是要用高质量的质粒 DNA。含大量切口或断裂的质粒 DNA 可能产生较高背景和因链断裂而出现的假性条带。双链 DNA 必须在测序前作

变性处理。本文叙述两种方便、快捷的质粒变性方法。

1）双链 DNA 通过下列两种快捷方法之一变性：

a. 碱变性法（不经沉淀）：在一个微型离心管中加入下述溶液：1～8 μl DNA（1～3μg），2 μl 1.0 mol/L NaOH，1 μl 引物（0.5～5 pmol），加水至终体积 11 μl，彻底混匀后 37℃ 保温 10 min。混合液放置冰上，加 2 μl 1.0 mol/L HCl，2 μl 质粒反应缓冲液至终体积 15 μl。继续步骤 2 进行复性。

b. 加热/乙二醇变性法：将下述溶液加入微型离心管中：1～7 μl DNA（1～3 μg），5 μl 质粒变性试剂，1 μl 引物（0.5～5 pmol），加水至终体积 13 μl，彻底混匀（混合物较黏稠）。90～100℃ 保温 5 min 后转移到冰水浴中，加 2 μl 质粒缓冲液至终体积 15 μl。继续步骤 2 进行复性。

2）在 37℃ 保温模板/引物/缓冲混合物 10 min 进行复性，冰上冷却。

3）进行标记步骤（3.2 节）。按照这些方法，标记反应的体积会大于上述容积。因此，将 4.5 μl 标记混合液转移到每一终止反应管内（G、A、T、C），按实验步骤继续进行（参见注释 1）。

4）用耐甘油凝胶缓冲液配制凝胶进行电泳。

3.5 在 96 孔微量反应板上进行测序

耐热的 96 孔 U 形底的反应板是同时进行几套终止反应的理想工具。应当注意不要让反应物蒸发至干。除非试剂是特别为反应板测序设计，复性和标记反应最好在小离心管里进行，终止反应则用反应板按下述步骤进行：

1）在反应板的恰当的孔内加 2.5 μl 终止混合液。

2）标记反应接近完成时，将反应板放在 37℃ 电热块上或 37℃ 水浴中使终止反应得以预热。

3）标记反应结束后将 3.5 μl 反应产物转移至四个终止反应孔的每一孔中，按常规混匀。

4）终止反应 37℃ 保温直到全部反应至少进行了 2 min，但不超过 10 min。

5）从 37℃ 水浴中取出反应板，加 4 μl 终止液到每一反应孔中。

6）临上样前在电热块上 75℃ 加热反应板 2 min 使反应产物变性。

3.6 增进靠近引物端的条带的强度

即使在 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 都存在的情况下，反应缓冲液中增加 Mn^{2+} 可改变各种 dNTP 与 ddNTP 反应强度之比高达 5 倍[15,16]。因此，测序反应缓冲液中加入 Mn^{2+} 与增加四种 ddNTP 的相对浓度具有相同的效果。这导致终止作用发生在接近引物结合位点，强化了接近引物部位的测序。这一作用的有利之处是当反应系统所含的 DNA 模板量少于正常量时，将导致接近引物处出现弱的条带。在 Mn^{2+} 存在的情况下，即使可利用的模板量较少，测序时也常会恢复接近引物的序列。在 Mn^{2+} 的使用中，只要在加稀释的酶之前将 1 μl Mn 缓冲液加到标记反应中便行了（2.5 节）。

也可在标记步骤中使用较少的脱氧核苷酸以获取接近引物处的序列。只要将 2.2 节中所讲的标记混合物中的核苷酸稀释四倍，使它达到 0.38 μmol/L，便能使离引物平均仅几个核苷酸处得以延伸。

3.7 离引物 400 个碱基之外的测序

离引物 300～400 个碱基处的序列，只须依据上述方法便能容易进行测序。为了进一步扩展序列，可利用序列延伸混合液以增加终止步骤中脱氧核苷酸与双脱氧核苷酸的比率，从而增加了平均延伸长度。该方法可延伸几千个碱基而不削弱接近引物的序列的信息。重要的是，应该记住虽然在测序反应中可将引物延伸达几千个碱基，但目前的凝胶技术还不能解析相对分子质量大于 700 个碱基长度的 DNA 分子。在用延伸混合液时，将每一终止混合液的量由 2.5 μl 减到 1.5 μl，并加 1 μl 的延伸混合液。这样就可以增加脱氧核苷酸与双脱氧核苷酸的比率达 2.5 倍，如有必要可通过实验决定使用其他比率。

3.8 压 缩 现 象

DNA 测序的最后步骤包括用变性聚丙烯酰胺凝胶按分子大小分离 DNA。完全按分子大小进行的分离就须从 DNA 分子中去掉全部二级结构，一般通过在胶里加进尿素并在较高的温度中进行电泳便可。凝胶电泳中无论何时出现结构稳定的 DNA 二级结构都会形成人为条带压缩现象。由凝胶上带与带之间出现异常的间隔可以认识这种压缩现象：几个序列条带较正常者更接近且无法解析，而在它上方的另一些带的间隔则比正常的大。要肯定这种压缩现象的存在，重要的是要看条带挤在一起（压缩）和条带间隔过大（“扩张”）这两种现象是否并存。

条带压缩可用下述两种方法之一加以解决：在测序反应中使用 dGTP 类似物或者增强胶的变性条件。使用核苷类似物作双脱氧测序既简便而有效。用 dITP[7,13]或 7-deaza-dGTP[13]作测序的核苷酸混合物见第二节。上述类似物取代 dGTP 后，DNA 产物与 dC 部位只形成较弱的碱基对，在凝胶电泳中容易变性。即使最不容易分开的压缩条带也可用 dITP 加以解析，而 7-deaza-dG 则不大可能解决全部压缩问题[7,34]。不过，重要的是在作 dITP 测序时要同时作 dGTP 测序，因为用类似物测序时往往会出现其他假象。

另一较好的解决方法是在胶中加进较强的变性成分。作者实验室常用 7 mol/L（不是 8 mol/L）尿素和 20%～40% 甲酰胺。与不用甲酰胺相比，这种凝胶的聚合须 3～5 倍的 TEMED。

3.9 解决四条泳道的同一位置上出现条带的问题

另一个常见的测序胶上的假象是四条泳道的同一位置上出现条带的现象，也称测序的“停止”或“暂停”。在这里可观察到带与带间的距离并不改变以区别于压缩现象。“暂停”可能由一个或几个不同的因素所造成。聚合酶可暂停在模板 DNA 的特殊的二级结构处，特别是使用如 dITP 之类的核苷酸类似物时。DNA 模板制备物不纯，进行各

步测序反应时的温度，或者混合不彻底，都可使聚合效能下降。一般来讲，在进行终止和标记反应时都必须仔细通过吸管反复吸放使其彻底混匀。标记反应应在低温（4～20℃）条件下进行，时间<5 min。终止反应进行前须将终止反应混合物在 37～45℃ 中预热，然后加入标记反应产物并继续保温 5～20 min。本文提出了几条减少“暂停”的建议（参见注释 4）。

4. 注　　释

(1) 在测序反应中，质粒变性试剂、酶的甘油稀释缓冲液或其他情况中加入甘油时，都有必要在测序凝胶系统中采用耐甘油的凝胶缓冲液，因为甘油将使一般测序胶上的条带发生严重的变形。见 1.4 和 2.4 节所载的 20×耐甘油胶缓冲液。

(2) 本文所载的标记 dATP 混合物的浓度相当于商品试剂盒的 1∶5 稀释液。

(3) 根据实验需要调整标记核苷酸的量。

(4) 关于减少“暂停”（四条泳道的同一位置上出现条带）的建议。

a. 降低标记反应的温度和/或缩短反应时间（例如 4℃、5 min）。

b. 降低 dNTPs 浓度（至正常量的一半或四分之一）使到达“暂停”部位继续延伸。

c. 对有问题的模板使用较多的聚合酶（例如超过正常 3～8 倍的量）可能解决条带“暂停”现象。要肯定至少所推荐量的聚合酶已完全混匀在标记反应物中（通过吸管的反复吹吸）。

d. 在标记反应中加入 0.5 μl *E. coli* ssb 蛋白有时能有效地消除“暂停”条带。如果使用 ssb，电泳前必须使之失活。加终止液后加入 0.1 μg 蛋白酶 K，65℃ 保温 20 min。

e. 使用高浓度的 dNTPs 和末端脱氧核苷酸转移酶的追加步骤可减少测序反应中的“暂停”，特别是在包含 dITP 的反应中[34]。以 TE 缓冲液配制四种 1 mmol/L dNTPs 母液。将母液中的末端脱氧核苷酸转移酶（TDT）稀释到 2 U/L，放置冰上，临用前稀释配制只供当时用的量。使用 dGTP 或 dITP 标记和终止混合物按两步法测序，**不要**加终止液。终止反应完成后，每一终止反应管里加 1 μl TdT 稀释液，37℃ 中保温 30 min。每一反应管内加 4 μl 终止液。按常规加热变性并上样测序胶。

f. 对于疑难的测序模板，在甘油存在的情况下煮沸变性对“暂停”条带的解析很有效。质粒测序见 3.4 节步骤 1b。

g. 或是对另一链用一新的引物或是在离“暂停”位点下50个碱基处引发聚合反应。

参 考 文 献

1. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74,** 5463–5467.
2. Modrich, P. and Richardson, C. C. (1975) Bacteriophage T7 deoxyribonucleic acid replication in vitro. A protein of *Escherichia coli* required for bacteriophage T7 DNA polymerase activity. *J. Biol. Chem.* **250,** 5508–5514.

3. Modrich, P. and Richardson, C. C. (1975) Bacteriophage T7 deoxyribonucleic acid replication in vitro. Bacteriophage T7 DNA polymerase: an enzyme composed of phage and host-specific subunits. *J. Biol. Chem.* **250,** 5515–5522.
4. Hori, K., Mark, D. F., and Richardson, C. C. (1979) Deoxyribonucleic acid polymerase of bacteriophage T7. Characterization of the exonuclease activities of the gene 5 protein and the reconstituted polymerase. *J. Biol. Chem.* **254,** 11,598–11,604.
5. Tabor, S. and Richardson, C. C. (1987) Selective oxidation of the exonuclease domain of bacteriophage T7 DNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **262,** 15,330–15,333.
6. Tabor, S. and Richardson, C. C. (1990) U.S. Patent 4,946,786.
7. Tabor, S. and Richardson, C. C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84,** 4767–4771.
8. Tabor, S. and Richardson, C. C. (1989) U.S. Patent 4,795,699.
9. Tabor, S. and Richardson, C. C. (1989) Selective inactivation of the exonuclease activity of bacteriophage T7 DNA polymerase by in vitro mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **264,** 6447–6458.
10. Tabor, S. and Richardson, C. C. (1990) U.S. Patent 4,942,130.
11. Patel, S. S., Wong, I., and Johnson, K. A. (1991) Pre-steady-state kinetic analysis of processive DNA replication including complete characterization of an exonuclease deficient mutant. *Biochemistry* **30,** 511–525.
12. Fuller, C. W. (1988) Sequenase® Version 2.0; a new genetically engineered enzyme for DNA sequencing. *Editorial Comments* **15(2),** United States Biochemical Corp., Cleveland, OH, pp. 1–4.
13. Mizusawa, S., Nishimura, S., and Seela, F. (1986) Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in place of dGTP. *Nucleic Acids Res.* **14,** 1319–1324.
14. Lee, L. G., Connell, C. R., Woo, S. L., Cheng, R. D., McArdle, B. F., Fuller, C. W., Halloran, N. D., and Wilson, R. K. (1992) DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Res.* **20(10),** 2471–2483.
15. Tabor, S. and Richardson, C. C. (1989) Effect of manganese ions on the incorporation of dideoxynucleotides by bacteriophage T7 DNA polymerase and *Escherichia coli* DNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86,** 4076–4080.
16. Tabor, S. and Richardson, C. C. (1990) U.S. Patent 4,962,020.
17. Fuller, C. W. (1989) Variation in band intensities in DNA sequencing. *Editorial Comments* **16(3),** United States Biochemical Corp., Cleveland, OH, pp. 1–8.
18. Fuller, C. W. (1988) DNA Sequencing; Sequenase® users observations. *Editorial Comments* **14(4),** United States Biochemical Corp., Cleveland, OH, pp. 1–7.
19. Kristensen, T., Voss, H., Schwager, C., Stegemann, J., Sproat, B., and Ansorge, W. (1988) T7 DNA polymerase in automated dideoxy sequencing. *Nucleic Acids Res.* 16, 3487–3496.
20. McArdle, B. F. and Fuller, C. W. (1991) Using Sequenase in automated DNA sequencing. *Editorial Comments* **17(4),** United States Biochemical Corp., Cleveland, OH, pp. 1–8, 17.
21. Tabor, S. and Richardson, C. C. (1990) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Effect of pyrophosphorolysis and metal ions. *J. Biol. Chem.* **265,** 8322–8328.
22. Ruan, C. C., Samols, S. B., and Fuller, C. W. (1990) Role of pyrophosphorolysis in DNA sequencing. *Editorial Comments* **17(1),** United States Biochemical Corp., Cleveland, OH, pp. 1–27.

23. Pisa-Williamson, D. and Fuller, C. W. (1992) Glycerol tolerant DNA sequencing gels. *Editorial Comments* **19(2),** United States Biochemical Corp., Cleveland, OH, pp. 1–7.
24. Fuller, C. W. (1989) The effect of excess glycerol on DNA sequencing gels. *Editorial Comments* **16(2),** United States Biochemical Corp., Cleveland, OH, p. 19.
25. Cotton, F. A. and Wilkinson, G. (1980) *Advanced Inorganic Chemistry,* John Wiley, New York, p. 298.
26. Chen, E. J. and Seeburg, P. H. (1985) Supercoil sequencing: a fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4,** 165–170.
27. Hattori, M. and Sakaki, Y. (1986) Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. *Anal. Biochem.* **152,** 232–238.
28. Haltiner, M., Kempe, T., and Tjian, R. (1985) A novel strategy for constructing clustered point mutations. *Nucleic Acids Res.* **13,** 1015–1026.
29. Lim, H. M. and Pene, J. J. (1988) Optimal conditions for supercoil DNA sequencing with the *Escherichia coli* DNA polymerase I large fragment. *Gene Anal. Tech.* **5,** 32–39.
30. Toneguzzo, F. Glynn, S., Levi, E., Mjolsness, S., and Hayday, A. (1988) Use of a chemically modified T7 DNA polymerase for manual and automated sequencing of supercoiled DNA. *Biotechniques* **6,** 460–469.
31. Hsiao, K. (1991) A fast and simple procedure for sequencing double-stranded DNA with Sequenase. *Nucleic Acids Res.* **19,** 2787.
32. Sequenase™ Quick Denature™ Plasmid Sequencing Kit, first edition (1993) United States Biochemical Corp., Cleveland, OH.
33. Gough, J. A. and Murray, N. E. (1983) Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DNA molecules. *J. Mol. Biol.* **166,** 1–19.
34. Fawcett, T. W. and Bartlett, G., (1990) An effective method for eliminating "artifact banding" when sequencing double-stranded DNA templates. *BioTechniques* **9,** 46–49.

第四十七章　线性和梯度缓冲液测序胶的灌注

Paul Littlebury

1. 引　　言

测序反应的产物在薄的、低浓度（一般为6%）的聚丙烯酰胺胶上被分开。通常情况下这种胶长40～50 cm、宽20 cm、厚0.3～0.4 mm。长达100 cm的胶和更宽的胶也可被灌制（以便阅读更长的序列和上样更多的克隆）。然而，大型胶难于在电泳后作固定、干燥、自显影等处理。本章所述方法只设计用于“标准”大小的测序胶，但对大型凝胶原则上是一样的，除了需要更多的胶混合液以及可能需要大小不同的梳子、隔条及玻璃板以外。

测序凝胶灌在两块以薄的隔条分开的玻板间，确保胶形成一致的厚度（厚度的改变将变更样品的移动率）。在仍处于模子中的凝胶上加样和进行电泳，玻璃板可为易碎的凝胶提供支撑物。因此，其中的一块玻璃必须切一个几厘米深、和玻板几乎等宽的凹槽，以便为阴极提供与电泳缓冲池的接触。凝胶的这一端在灌胶后立刻插进梳子以形成加样孔，梳子与隔条厚度相同。它们均可买到，也可采用制模卡（Plastikard™）按需要进行切割后自制。适用于宽20 cm的胶、上样12个克隆的典型的梳子应具有50个齿（2 mm宽、3 mm深）。本章介绍如何灌制线性胶和梯度缓冲液胶。

线性胶最便于灌制，但每一克隆常只能阅读序列的200～250个碱基，因凝胶的解析度沿胶的长度而改变。在凝胶的底部条带占有较宽的空间并有较好的解析度，但接近胶的顶部则条带间距缩小而难以读出序列。与线性胶相比，由于梯度缓冲液胶[1]的底部30%的胶里的DNA分子的移动减慢了，从而增加了可读序列的量。这种方法可将小分子滞留在凝胶上，使位于顶部凝胶内的分子电泳较长的时间，因此它们可得以较好地分开。配制梯度胶要求在胶的底部加进较高浓度的离子。因此灌注梯度缓冲胶须用两种不同离子浓度的胶混合物，首先以较高浓度的混合物灌注，接着灌注较低离子浓度的胶。灌制梯度胶需要一些经验，因为要确保梯度正确地形成以免序列变形。

2. 材　　料

1）10×TBE：108 g Tris，55 g硼酸，9.3 g EDTA（二钠盐），加去离子水到1 L。如果形成沉淀则丢弃。

2）40%丙烯酰胺（19∶1）：380 g丙烯酰胺（Electran-BDH），20 g N, N′-亚甲双-丙烯酰胺（Electran-BDH）加去离子水到1 L。加20 g Amberlite MBI树脂，轻轻搅拌10 min，过滤后4℃中保存（参见注释1）。

3）0.5×TBE 凝胶混合液：75 ml 40% 丙烯酰胺（19∶1），25 ml 10×TBE，230 g 尿素（超纯级）。加去离子水到 500 ml。过滤后 4℃ 中保存可达一个月。
4）5×TBE 6%凝胶混合液：30 ml 40% 丙烯酰胺（19∶1），100 ml 10×TBE，92 g 尿素（超纯级）。加去离子水到 200 ml。过滤，4℃ 中保存可达一个月。
5）25% 过硫酸铵：加在去离子水中到 25%（v/w）浓度。4℃ 中可保存几个月。
6）TEMED：N,N,N′,N′-四甲基-1,2-二氨基乙烷。4℃ 中保存。
7）二甲基二氯硅烷溶液：硅烷化玻板用。
8）玻璃板：50 cm×20 cm。
9）隔条：50 cm×0.5 cm ×0.35 mm 厚的塑料制品。
10）梳子：5 cm×15 cm×0.35 mm 塑料制品。
11）防水黏胶带及折叠夹子。

3. 方　　法

3.1　测序玻板的安装

1）温水清洗一对玻璃板，然后用蒸馏水淋洗。如果每次使用后玻板都保持清洁，并无必要用清洁剂处理，玻板置空气中干燥。
2）在通风柜中硅烷化每一玻板的一面（参见注释 2）。用纸巾对所选择的一面涂布 2 ml 硅烷剂，注意使玻板面全部涂满，玻板留置在通风柜中 5～10 min 待干燥。
3）用少量乙醇揩洗玻板，确保玻板光亮无尘埃，否则在灌胶时将引起凝胶起泡（参见注释 3）。
4）沿一块（常是不带凹槽的一块）玻璃板的每一长边各放置一个隔条，将第二块玻板正对第一块摆放，使两个硅烷化的面形成胶模的内壁。
5）在一侧用夹子夹住玻板，以胶带封住玻板的另一侧和底部，将夹子转换到已封住的一侧，然后封住全部的边。如有必要的话，可用胶带沿底部和两角封第二层，以减少漏胶的可能。

3.2　线性测序凝胶的灌制

1）将 50 ml 0.5×TBE 的 6%的凝胶混匀并加热达室温。
2）上述胶中加 100 μl 25% 过硫酸铵和 100 μl TEMED，转动混匀。
3）将凝胶吸进 50 ml 针筒内（不用针头），以稳定流速注射到玻璃板模的两块玻璃板间。胶进入玻板的流速可通过改变玻板的角度来控制。
4）一旦凝胶注满到胶模的顶端，以正好超过梳齿根部为度插入梳子。夹住玻板的顶部及底部，以确保凝胶厚度均匀一致。放置 30 min 使凝胶聚合（参见注释 4）。

3.3　梯度缓冲液凝胶的灌制

1）预热凝胶混合液达室温。制备缓冲液梯度胶需要 50 ml 0.5×TBE 凝胶混合液及 10

ml 5×TBE 凝胶混合液。

2）将 100 μl TEMED 和 100 μl 25% 过硫酸铵加入 0.5×TBE 凝胶混合液中，并取 20 μl TEMED 和 20 μl 25% 过硫酸铵加到 5×TBE 凝胶混合液中。

3）使用 25 ml 吸管吸取 7 ml 0.5×TBE 凝胶混合液，接着再吸取 7 ml 5×TBE 凝胶混合液（参见注释 5）。该两种凝胶混合液应在界面上混合，方法是用吸管吸进少量气泡，使它们在凝胶混合液中逐渐上升。

4）将混合液从一侧或胶模的中心灌入。

5）一旦吸管排空，降低模子到水平位置以阻止凝胶进一步流动。将剩余的 0.5×TBE 凝胶混合液吸到 50 ml 注射器里，把它注入胶模达顶部而把梯度混合液冲到底部。插入梳子，夹住玻板，放置 30 min 使凝胶聚合。

4. 注　　释

(1) 丙烯酰胺为一种强烈的累积性的神经毒物。称量或处理含丙烯酰胺的固体或液体应戴手套和面罩。凝胶应在塑料盘中灌制以防泄漏和溅出。聚丙烯酰胺被认为是无毒的，但仍应戴上手套，因为可能有残存的未聚合的丙烯酰胺存在。

(2) 许多人只硅烷化一块玻璃板，理论上凝胶会黏着在未硅烷化的一块玻璃板上。但实际上并非如此，凝胶似乎以相同的效率黏着在任何一块玻板上，因而对两块玻板硅烷化似乎有助于凝胶的灌制。

(3) 如果出现气泡的话，可用以下两种方法加以排除。使胶模装置处于垂直位置并轻轻拍打玻板，气泡就会升到胶顶并消失。或者，可用一旧的 X 射线底片将气泡推到凝胶的一侧，在这个位置上不会干扰样品的电泳。

(4) 凝胶聚合的速率可通过改变 TEMED 量来控制。初次灌注梯度凝胶时如果把 TEMED 减少 10～20 μl 常常是有帮助的，这会给新手提供更多时间来灌胶并排除灌胶中形成的气泡。

(5) 使用缓冲液梯度凝胶时，只须改变两种混合液的离子浓度就可改变梯度。例如，加入的 5×TBE 混合液越多，梯度就越陡。

参 考 文 献

1. Biggin, M. D., Gibson, T. J., and Hong, G. F. (1983) Buffer gradient gels and ^{35}S label as an aid to rapid DNA sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80,** 3963–3965.

第四十八章　测序反应样品的电泳

Alan T. Bankier

1. 引　　言

Sanger[1]或者 Maxam 和 Gilbert[2]的 DNA 测序方法都是根据能够对长度只差一个核苷酸的单链 DNA 分子进行分离和解析的原理。已有报道称可在 1 m 长的变性聚丙烯酰胺凝胶上对长度为 0.6 kb 的序列作出解析[3]。

阅读长序列更为实用的系统采用较短的缓冲液梯度凝胶（参见第四十七章）多次上样（电泳时间约 3 h 和 6 h），并将聚丙烯酰胺的浓度降低到 3.5%。即使用了这些技术，在常规操作中，测序精确性的限度估计为每一模板 450～500 个核苷酸。在具有重复性特点的鸟枪法中，跑胶似乎成了限速步骤，这使得在每一次缓冲液梯度凝胶电泳或楔形凝胶电泳中以阅读 350 个碱基为更有效[4~6]。电泳后对凝胶作放射自显影处理，由于具放射活性的同位素标记的碱基已通过聚合反应而掺入，因而可呈现每一条带的位置。用荧光方法观察样品现在常用相似于胶片曝光的方法检测条带[7]。自动化的荧光检测方法可用来直接在胶上进行检测，而不须对凝胶进行处理和自显影（参见第五十一章）。

在 ^{32}P 标记的测序中，可在覆盖保鲜膜的湿胶上进行直接自显影，但凝胶干燥后自显影可获得较大的解析度。凝胶底部的放射性粒子向各个方向放射出来，使位于凝胶表面的曝光结果显得宽而弥散。如果凝胶在放射自显影之前干燥，这种放射状的扩散可明显减少。如果用 ^{35}S 标记，因发射光的能量较低，所以必须对凝胶先行干燥处理。最方便的是用加热的真空干燥器干燥凝胶，需时＜1 h。

在已经考虑到亚克隆方法中的所有问题，例如冒着健康危险处理有害物质，不经意地操作一些极微量的试剂，以及成功地处理了可能导致自显影图谱弯曲变形的易于破裂的凝胶之后，在操作中的最困难的事情还可能依然存在。准确阅读测序胶片是一项技术性较强的工作。虽然有一些像本章一样的准则可供遵循，但没有任何东西可替代来自对已知序列和推导的序列的比较并调整两者的差异而得来的实际经验。有几种胶片扫描仪和旨在解释测序数据的软件可以利用，最有名的如 Amersham Autoreader（Amersham, Arlington Heights，IL）。这类仪器的性能在逐步改良，但就总体而言，它们均依赖于输入资料的质量。归根到底任何机器都难以接受实际上难以阅读的胶片。

2. 材　　料

1）凝胶电泳仪器。仪器不须要太复杂，因为满意的结果可用较便宜和简单的系统取得。

2）至少能提供 2000 V 电压的高压电源（直流输出），供 20 cm×50 cm×0.3 mm 厚的

凝胶用的电泳条件为1500 V、30 mA左右。

3）10×TBE：108 g Tris 碱，55 g 硼酸，9.3 g Na_2EDTA，以去离子水溶解，配成终体积1 L。

4）甲酰胺染料混合液：100 ml 去离子甲酰胺，0.1 g 二甲苯青 FF，0.1 g 溴酚蓝，2 ml 0.5 mol/L Na_2EDTA。染料混合液在一般温度中可保存几个月而几乎不会影响结果，但建议溶液分装小份后冰冻保存。甲酰胺为危险品，刺激皮肤和眼睛。

5）用狭窄或扁平头的一次性吸嘴上样，也可使用装细针头的 Hamilton 小针筒。有经验的人常用接在用嘴吸的管上的拉尖的毛细管，但出于安全的考虑，应当尽量避免这类操作。

6）Whatman（Maidstone，UK）3 MM 滤纸，按稍大于凝胶的大小切割。

7）Saran Wrap 或相当的膜，如不渗水的食物保鲜膜。

8）凝胶干燥器，Savant（Hicksville，NY）SGD4050 或 BioRad（Richmond，CA）SE1125B。

9）高压真空泵。油泵需要精心地维护，如果凝胶在干燥前固定，醋酸将迅速损坏油泵。聚氟乙烯隔膜泵需要的维护较少，价格便宜（例如 Vacuubrand GMBH）。

10）Fuji RX 或相当的 X 射线底片。某些底片曝光速度很快（较为昂贵），但不一定适用于自动测序。

11）自显影用的不漏光底片匣。

12）底片加工用的试剂。

3. 方　　法

本文所描述的方法包括三个方面：凝胶电泳、自显影和读胶。

3.1 凝胶电泳

1）从聚合的胶底部取去全部胶封带，从凝胶顶部取出梳子，并用去离子流水冲洗样品孔（参见注释1）。

2）如果使用鲨鱼齿梳子，小心地将它横跨胶的整个宽度均匀地插到整个胶面里，直到梳齿正好进入胶的表层。

3）将凝胶和电泳槽装配好，使带凹槽的玻璃板面向上面的缓冲液槽，在上下缓冲槽中都装满1×TBE。

4）用 TBE 彻底冲洗样品孔，用滴管或注射器吸出全部未聚合的丙烯酰胺。凝胶预先电泳不是绝对必要的，但如果需要的话，可将仪器盖上盖，接上高压电源，30 V/cm 大约电泳 30 min（参见注释2）。

5）如果样品保存在 -20℃，则在冻融后每管加 2 μl 甲酰胺染料混合液。临上样前将样品作变性处理后放置冰上。试管中制备的样品应当在 70℃ 中变性 3 min。

6）切断电泳电源，冲洗顶部凝胶的样品孔以排除扩散出凝胶的尿素。

7）用一装在小容量吸管上的细口聚丙烯吸嘴在每一孔中加入约 2 μl 样品。同一吸嘴只

须在下面的缓冲液槽中淋洗一次便可重复使用。如果由于气泡使少量样品阻塞在吸嘴中，可把吸嘴丢弃在放射性废物箱中并换一新的吸嘴（参见注释 3 和 4）。

8）待所有的样品都已上样后盖上盖子并接通高压电源。在约 30 V/cm 条件下进行电泳，直到溴酚蓝到达或超出凝胶的底部（参见注释 5 和 6）。

3.2 凝胶的干燥和自显影

1）电泳完成后切断电泳装置的电源，倒掉上槽中的缓冲液，按推荐方法处理下槽中放射性缓冲液。从电泳装置中取出整体凝胶及其支撑玻板，去除留在上面的封闭胶带。

2）将有凹槽的一端向上，在两块玻板间插入刮刀并轻轻转动刮刀以撬开两块玻璃。假如凝胶粘着在带凹槽的玻板上，取出刮刀后连同胶和玻板整体倒过来，撬开背面的玻板。如果凝胶始终同时粘着在两块玻板上，最好将整体浸于水中或 10% 醋酸中，这时撬动玻板时便可以使凝胶与上面这一玻板上脱离。将一块坚实的塑料网覆盖其上，在其后的操作中凝胶就可保持这一状态（参见注释 7）。

3）在浅盘内将胶浸没在约 1 L 10% 醋酸中 10～15 min 以透析出尿素。如果浅盘底上没有高出的脊梁，则应不时地轻轻摇动液体。取出仍处在玻璃板上的胶，尽可能地沥干上面的液体（参见注释 8）。

4）从一端向前或从中心向两端展开卷拢的 3 MM 滤纸，使纸平稳而均匀地放在胶上并将凝胶转移到纸上，轻轻地使纸直接完全接触整个胶面，然后将纸揭离玻璃板。

5）将一层保鲜膜（Saran Wrap）覆盖胶面，切除过多的 3 MM 滤纸或膜。修剪胶的顶部和各边，使之能放进凝胶干燥器，在真空中 80℃ 烘干 15 min。

6）从干胶上取下保鲜膜，将干胶放入不漏光的 X 射线片匣中使与底片紧密接触。曝光时间根据不同的标记物而定，如果上样的是全部样品，而且使用 ^{35}S 作为标记物，则曝光 18～36 h 较恰当，如用 ^{32}P 则理想曝光时间可短到 1 h（参见注释 9）。

7）按照供应商推荐的方法处理 X 射线底片。

3.3 读　　胶

原则上，从自显影底片的四条轨道上的条带来推导一个序列应当是简单的。由于各种分子根据其相对分子质量大小被分开，所要做的无非是确认从底部到顶部连续条带的位置。如果下一条带出现在 A 泳道上，那么该序列的下一个碱基必定是 A 碱基。

几种情况可能搅乱这一理想的状况。两条带的前后位置可能不清晰，特别是所关注的条带是在靠外侧的轨道上。两个或更多的条带可能占据了同样的垂直位置，或者一些假条带妨碍我们对特定位置上碱基的确认，在一些理应出现条带的位置上却似乎是空着的。除上述种种情况以外还可能有模板质量差，测序反应不完全以及凝胶电泳和自显影等方面的问题。

大概读胶的最好教训是知道什么时候该不读。大多数错误是尝试阅读劣质胶片上的序列或者是过于深入到解析度较差的区域。最终，错误读序将不得不与其他准确的序列进行协调，这将是很耗时的。很常见的情况是放置几周或数月后再读胶片时，第一印象

是完全不敢相信曾经读过这个序列。

读胶的准则中包括一般性的叙述以及特定克隆或测序方案所预期的非常特殊假象的叙述。这里只叙述直接有关的内容，然后再涉及其一般内容。许多假象可能与特殊试剂有关，它们可通过对照加以验证。

3.3.1 有关读序的一般问题

1）由于在凝胶上产生的许多不正常条带的迁移速率问题往往与较高的 G/C 序列有关，所以将这两个轨道放在彼此邻近的位置比较合理。最常用的轨道排列为 ACGT 和 TCGA。
2）读序前应先对数据做一般性的质量评价并决定是否值得读序。应当综观条带的清晰度、弥散物背景存在与否，以及有无额外条带。
3）确保最适当的曝光时间。曝光过短可能使弱条带消失。曝光时间过长可能增加弥散背景和假象。如果使用^{32}P，过度曝光将大大地降低解析度。
4）标出或描出四条轨道以免各条轨道间相互混淆，并且标出端点。这点可能就是质量和解析度低于所要求的标准的位置，或者是短的插入片段连接到载体的位置。
5）阅读条带的间隔可能与阅读条带本身一样重要。始终要注意所关注的条带位置上是否出现空隙。在条带次序含糊的地方，常常可通过比较附近区域中邻近条带的间隔而推论正确的条带次序。在一特定的空隙里，应当能估计出该有多少条带。
6）如果连续出现不能解释的条带，使用鲨鱼齿梳可能对正确读胶有所帮助。采取这一措施后，在相邻轨道常可发现小的重叠，从而使序列解释变得容易。
7）读序不要中途停顿，一旦开始便应从下至上一次读完。停顿一会儿后，很可能从错误的点重新开始阅读，尤其是在具有重复序列时更是如此。
8）自显影片上的小斑点或线条常因为胶上的气泡或颗粒引起，一般可以避免。灌胶前应确保玻璃板清洗干净。避免用卷筒纸来擦洗，以免在玻璃板上留下颗粒。
9）出现模糊的斑块，可能是凝胶与底片未能紧密直接接触的缘故，或者是凝胶聚合得不均匀所致。这些斑块也可能是因为电泳过快而引起局部温度过高所致。

3.3.2 测序中的常见问题和假象

1）高弥散背景一般与特定的 DNA 模板有关。用酚或氯仿抽提和乙醇沉淀以进一步纯化模板并不总能解决背景问题。
2）条带强度的差异常由酶的内在性质所决定。它们是碱基序列特异的，并以可预测的状态出现。测序酶中加入锰离子可使条带强度非常均一。
3）“条带堆积”。四条轨道上几乎在同样的位置上出现条带，这是非特异性终止的结果。主要原因是聚合酶不能通过模板内的二级结构（不同的聚合酶或不同批号的同样的酶可在一定程度上解决该问题），或者由于双链 DNA 复性而导致聚合反应的阻断，这在 PCR 产物的测序中是相当常见的现象。这两个问题均可通过促使模板内结构不稳定而得以缓解，例如可增加延伸反应的温度或降低反应溶液的盐浓度。如果不能解决问题，则必须更换聚合酶，这种情况最可能的原因是使用了低质量的酶。
4）影子带，即在其他轨道上的微弱的额外条带，可能是由于下述几个原因之一。假如

阴影只出现在邻近的轨道上，这可能是由于样品溅到旁边的孔中所致。随机分布的弱的条带可能意味着存在第二背景序列。这可能起因于从琼脂平皿上挑取噬菌斑时因疏忽而碰到了另一噬菌斑，或由于噬菌体在生长中发生缺失而使模板丰度下降，或者是与非特异性的引物结合的缘故。最后，一些微弱的假带是某些聚合酶特有的，它出现在什么位置由碱基序列所决定。

5）比较清楚但却很微弱的条带可能是模板或引物浓度较低所引起，或因复性温度过高而导致引物结合效率不高所致。

6）“压缩”，在序列的特异位置上条带间隔所占空间减小或缺失，伴随一个异常大的空白区，这可能是在凝胶电泳过程中的二级结构所导致。

7）条带强度分布不均衡，表示双脱氧核苷酸和脱氧核苷酸比率不恰当。在较短距离中出现强度高峰意味着双脱氧核苷酸浓度太高，而较长距离中呈现高强度峰则表示双脱氧核苷酸浓度过低。在对于测序酶所推荐的两步标记方法中，类似的条带强度问题则因模板浓度变化而引起，例如模板浓度低则增加较长分子的强度。

8）在一个轨道上根本不出现条带，常由于偶尔忘了加入某一成分之故。在一组四个轨道上都不出现条带，则或是由于复性时没有加入引物或缓冲液，或是没有能从 DNA 制备物取得模板，或是引物不恰当，或是在重组子中发生了引物结合位点的缺失之故。

4. 注　　释

（1）取出梳子后必须立即淋洗胶孔，因为任何留下的未聚合的丙烯酰胺可能随后聚合而造成不均匀的凝胶表面，临上样前冲洗孔可以去除从胶中析出的尿素，以便在上样中得到紧密的条带。

（2）“微笑”是指靠近凝胶边缘的样品的移动慢于中央的样品，起因于横跨凝胶各处的热量损失（因而也是温度）不均匀。可以采用两种简单的方法进行补救：第一，在离凝胶边缘 2 cm 处不加样品，因为在这里温度的变化最大；第二，把一张铝膜放在玻板的外表面，它能使凝胶各处的温度较为均匀。此外还有多种更为巧妙和费用较大的温度控制方法，不过除了在自动系统那样的特殊情况中，它们并不必需。

（3）如有可能，比较好的方法是在离孔底部 1～2 mm 处上样，而不是从顶部慢慢地注入，这样可以得到一个明晰的样品条带。

（4）用微量滴定板可以延长变性时间（80℃、20 min），这样就可以减小体积而便于全部样品的上样。为了调整体积，可以变更变性时间。例如，用装有风扇的温箱就可以大大地缩短时间。在试管内进行变性的样品中只能加样一部分，因其体积不会减小过多。不要试图加过量样品。作为一个准则，样品高度应小于胶孔的宽度，而理想情况则要求小得多。

（5）本方法所要求的条件须要有稳定的电压。实际上在恒功率条件下进行变性胶电泳最理想，因为凝胶温度是最重要的控制因素。胶内温度应达到 60～70℃。对 20 cm×50 cm×0.3 mm 厚的胶，35～40 W 恒功率足够使用。如果仍然有“压缩”现象出现，此时甚至要求增加功率以使凝胶有更高的温度。

(6) 当然，停止电泳的准确时间应由引物的长度和从引物开始的待读距离以及丙烯酰胺的浓度所决定。如果用通用引物，在 6%凝胶上 M13 的克隆位点大致上相当于溴酚蓝标记的位置。

(7) 当撬开玻璃板时，不要对着带凹槽玻璃板两侧的“耳部”抬起，这些地方较脆弱容易破裂。

(8) 凝胶干燥前不须要固定。未经固定的胶在 80℃真空干胶器中干燥须经 45～60 min，如果无真空干燥器，可在空气中干燥过夜。

(9) 应用薄层胶和用^{35}S 标记物旨在改善解析度。使用单面 X 射线底片有利于自显影解析度的提高，但必须注意感光乳胶面对着干燥的凝胶并揭去保鲜膜。

参 考 文 献

1. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74,** 5463–5467.
2. Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74,** 560–564.
3. Ansorge, W. and Barker, R. (1984) System for DNA sequencing with resolution of up to 600 base pairs. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **9,** 33–47.
4. Bankier, A. T. and Barrell, B. G. (1983) Shotgun DNA sequencing, in *Techniques in Life Sciences, Nucleic Acid Biochemistry* vol. B5 (Flavell, R. A., ed.), Elsevier, Ireland, pp. 1–34.
5. Biggin, M. D., Gibson, T. J., and Hong, G. F. (1983) Buffer gradient gels and ^{35}S label as an aid to rapid DNA sequence determination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80,** 3963–3965.
6. Bankier, A. T. and Barrell, B. G. (1989) Sequencing single-stranded DNA using the chain termination method, in *Nucleic Acids Sequencing: A Practical Approach* (Howe, C. J. and Ward, E. S., eds.), IRL, Oxford, pp. 37,38.
7. Beck, S. (1993) DNA sequencing by chemiluminescent detection, in *Methods in Molecular Biology, vol. 23: DNA Sequencing Protocols* (Griffin, H. G. and Griffin, A. M., eds.), Humana, Totowa, N. J., pp. 235–242.

第四十九章　PCR 产物的直接测序

Janet C. Harwood, Geraldine A. Phear

1. 引　　言

聚合酶链式反应（PCR）方法的发明使得通过两个寡核苷酸引物的杂交及其后由 *Taq* 聚合酶催化的中间序列的扩增而使快速分离 DNA 序列成为现实。该技术有多种用途，最为有用的一种是在大量的样品中在特定座位上搜寻突变位点，例如用在临床研究或培养细胞系的分析中[1~3]。如果没有 PCR 技术，进行上述工作只能是分离每一个体的 DNA，制备各个基因文库并逐一进行筛选。PCR 技术的应用意味着先前花一个月检查一个样品，现在检查几个样品只须花几天时间。另外，通过冗余引物的应用，甚至可能分离和它相关的新的基因。

为要充分利用这一技术，必须能够对所扩增片段作快速测序。不过 PCR 产物的测序面临一个主要的技术问题。用于 PCR 反应的寡核苷酸引物也同时用作测序反应的引物。由于多个序列的重叠，使得测序胶片难以阅读。已有许多方法曾被用来解决这一问题。起初，PCR 产物被克隆进一个适于测序的载体[4]。然而，该方法有两个缺点：①该方法较耗时；②每一克隆只代表来自 PCR 产物的单个分子，而为了避免因为 *Taq* 聚合酶的不忠实性而造成的人为不可靠因素，必须测定几个克隆的序列。PCR 产物的直接测序可减少上述错误，因为模板是 PCR 扩增的全部产物的一个样本。

直接测序有两种基本的方法。第一，双链模板可从寡核苷酸引物中纯化。这里有许多方法可供选择，包括凝胶纯化和根据分子筛原理利用 GeneClean™或 Centricon™柱分离大小不等的 DNA 分子。第二，PCR 双链 DNA 产物可用作制备单链 DNA 的模板，可经非对称 PCR 反应达到这一目的[5,6]。此外，还可使 PCR 反应作某些变化，使其中一个引物成为带有生物素的链，于是，使含生物素的单链结合到链霉抗生物素结合蛋白(streptavidin) 包被的磁性颗粒上，便能纯化出单链模板[7]。虽然许多这些方法都得到过成功的应用，但测序前 PCR 模板均须进行其他多项处理。

这里介绍的是对 PCR 产物进行直接测序的一个简单而快速的方法，其基础是先前报道过的两个方法[4,8]。如果具备内部测序引物，那么对小于 2 kb 的 PCR 产物的测序来讲，这是一个理想的方法。双链模板在末端标记引物存在的情况下通过煮沸并立即在冰水里冷却而变性，这样可阻止模板恢复原状并有利于模板-引物的复性。其后的测序步骤是经改良的双脱氧核苷酸测序技术[9]。

用作测序引物的末端标记的寡核苷酸位于 PCR 引物的内部，即所谓巢式引物。这种方法具有几个优点：

①不须要从模板中除去 PCR 引物。由过量的 PCR 引物所发动的测序反应的产物不会被检出，因为 PCR 引物不是放射性标记的。这一最低限度的模板纯化操作将

减少材料的损失而使它足够为测序所用。

②测序引物是存在于 PCR 引物内部的第三个寡核苷酸，对所需要的 PCR 产物来讲又是特异的，它不与非特异的 PCR 产物复性，因此，测序特异性达到了最大程度。

③这一技术的灵敏度很高，每作一次测序反应只需 150 ng 的模板。

这方法的缺点是需要一个“巢式”测序引物。不过只要把 PCR 反应中所用的寡核苷酸首先从模板里排除，就可用其中一个 PCR 引物来进行 PCR 产物的测序。

这一方法可顺利地用于以 20 mer 引物对约 250 bp 的 PCR 产物的测序。它也适用不同长度的 PCR 产物和引物。然而所用材料的量必须调整到保持摩尔比率为 1 pmol 模板:3 pmol引物（参见注释 1）。

2. 材　　料

全部试剂应达到分子生物学所需的标准，用分子生物学级的试剂和灭菌蒸馏水配制。测序试剂可购买商品试剂盒。

2.1　寡核苷酸引物的末端标记

1）γ－［^{32}P］ATP：5000 Ci/mmol，Amersham（Arlington Heights，IL）。这是一种释放高能量 β-射线的放射性物质，因此必须采取适当防护措施（参见注释 2）。

2）10 × 多核苷酸激酶缓冲液：0.5 mol/L Tris-HCl、pH 7.6，0.1 mol/L $MgCl_2$，50 mmol/L DTT，1 mmol/L 亚精胺，1 mmol/L EDTA、pH 8.0，分装后 －20℃ 保存。

3）PCR 序列特异性的巢式寡核苷酸引物：0.1μg /μl 水溶液（参见注释 3）。

4）多核苷酸激酶（10 000 U/ml，New England Biolabs，Beverly，MA）。

5）TE：10 mmol/L Tris-HCl，1 mmol/L EDTA、pH 8.0。

6）Sephadex G50（Pharmacia，Piscataway，NJ）用 TE 装柱（参见注释 4）。

2.2　PCR 产物的纯化和测序

1）3 mol/L 醋酸钠、pH 5.2。

2）100％乙醇。

3）5×测序酶缓冲液：200 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，100 mmol/L $MgCl_2$，250 mmol/L NaCl。

4）0.1 mol/L DTT：－20℃贮存。

5）标记混合液：每一种 dNTP 7.5 μmol/L 溶液。配制标记母液：7.5 μl 1 mmol/L dATP，7.5 μl 1 mmol/L dCTP，7.5 μl 1 mmol/L dGTP，7.5 μl 1 mmol/L dTTP，加 970 μl 水，－20℃ 贮存。用水稀释 8 倍作为工作标记混合液。

6）测序酶：（Version 2.0 USB，14 U/μl）：临用前加冷 TE 稀释 8 倍到 1.75 U/μl。

7）终止混合液：每一种核苷酸(即 A, C, G 和 T)需要一种终止液。由80 μmol/L 每一种 dNTP 和8 μmol/L 相应的双脱氧核苷酸(ddNTP)在50 μmol/L NaCl 中组成。

终止混合液按下述成分配制（全部以 μl 为单位）：

	A 混合液	C 混合液	G 混合液	T 混合液
10 mmol/L dATP	8	8	8	8
10 mmol/L dCTP	8	8	8	8
10 mmol/L dGTP	8	8	8	8
10 mmol/L dTTP	8	8	8	8
1 mmol/L ddATP	8	—	—	—
1 mmol/L ddCTP	—	8	—	—
1 mmol/L ddGTP	—	—	8	—
1 mmol/L ddTTP	—	—	—	8
1mol/L NaCl	50	50	50	50
水	910	910	910	910

8）甲酰胺染液：95％甲酰胺（v/v），20 mmol/L EDTA，0.05％溴酚蓝（w/v），0.05％二甲苯青（w/v）。

9）测序胶：0.4 mm 厚，6％变性聚丙烯酰胺凝胶。

10）固定液：10％醋酸/10％甲醇（v/v），可在室温贮存并重复用 4～5 次。

11）自显影底片：如 Kodak XAR5。

3. 方　　法

3.1　测序引物的末端标记

这里我们叙述的是 200 ng 寡核苷酸的标记，它足够用于 10 次测序反应。这一标记反应也可用于 100 ng 的量（参见注释 5）。

1）在 1.5 ml Eppendorf 管中干燥 100 μCi γ-［^{32}P］ATP。

2）放在冰上，然后依次加入 5 μl 水，1 μl 10×多核苷酸激酶缓冲液，200 ng（2 μl）寡核苷酸，2 μl 多核苷酸激酶（20 U）。

3）37℃保温 1 h。加 90 μl TE 到反应液中，在 Sephadex G50 离心柱上离心已标记的寡核苷酸，以 1.5 ml Eppendorf 管收集过柱的液体。

4）将样品干燥，加水重悬至 10 ng/μl，－20℃中冷冻到使用时为止。

－20℃条件下，标记的寡核苷酸可保持稳定几周，但由于其放射性半衰期的原因，使用期是有限的。

3.2 PCR 产物的制备和测序

模板测序前，应作琼脂糖凝胶电泳估计 PCR 产物的量。每一测序反应至少需要 150 ng PCR 产物。

1）整个 PCR 反应物通过经 TE 平衡的 Sephadex G50 离心柱离心。注意不要混进石蜡油，如有必要可用氯仿抽提去除。用 1.5 ml Eppendorf 管收集洗脱液，这一步去除

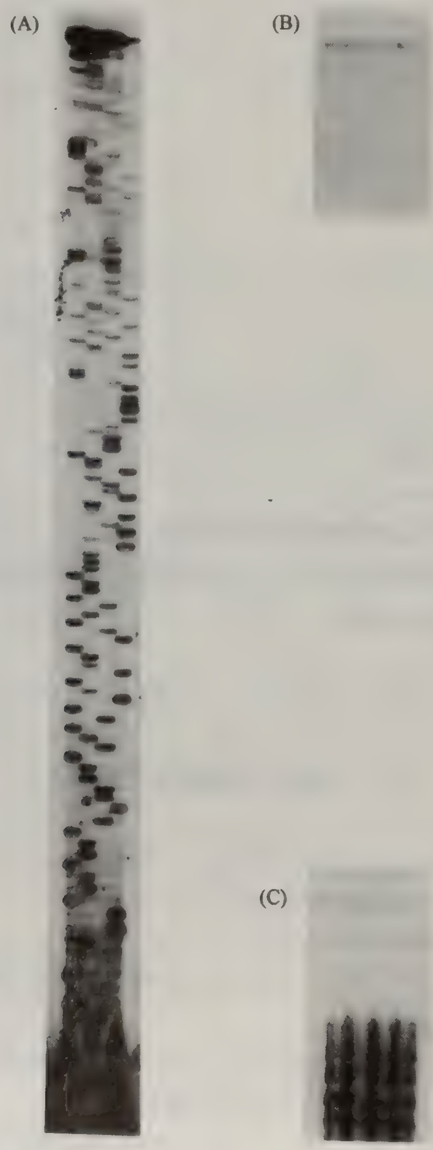


图 49.1 （A）用^{32}P 标记的巢式引物对 PCR 产物进行测序所取得的放射自显影图谱。（B）凝胶的上部，显示经复性并延伸但并未终止的充分延伸产物。（C）凝胶的底部，显示未延伸的游离的末端标记引物。

了 PCR 反应中过多的 dNTPs。

2）测量反应物体积，加 0.1 体积的 3 mol/L 醋酸钠、pH 5.2，加 2.5 体积乙醇沉淀 PCR 产物，置干冰上 15 min，或 -20℃ 中放置过夜。
3）4℃ 中以 12 000 *g* 离心 15 min。除去上清液，短暂干燥沉淀，用灭菌蒸馏水稀释到终浓度 150 ng/μl。
4）在 0.5 ml Eppendorf 管中混合 1 μl（150 ng）PCR 产物、2 μl（20 ng）标记引物、2 μl 5× 测序酶缓冲液以及 5 μl 水。
5）试管煮沸5 min 后立即在冰水中放置5 min 使引物与寡核苷酸复性(参见注释6和7)。
6）在微型离心机上离心几秒钟以收集管壁上的液体，加 1 μl 0.1 mol/L DTT、2 μl 标记混合物工作液和 2 μl 稀释的测序酶，室温保温 5 min（参见注释 8）。
7）当标记反应进行时，在 4 个 1.5 ml Eppendorf 管上标明 A、C、G 和 T，在各管中加 2.5 μl 的相应的终止液。
8）在第一次 5 min 保温结束时，在每一终止混合物管中加入 3.5 μl 标记反应物，37℃ 保温 5 min。
9）加 4 μl 甲酰胺染料液，-20℃ 贮存直到使用时。在 -20℃ 中这些反应物在一周内都是相当稳定的。
10）上样到测序胶上前将测序反应物在 95℃ 中加热 3 min。电泳进行到溴酚蓝恰恰走出胶底为止，这时多余的标记引物正好走出凝胶，但仍能读出离引物 20 bp 范围内的序列。
11）将凝胶转移到一片 3 MM 滤纸（Whatman，Clifton，NJ）上。或者就在测序凝胶玻板上固定。在固定液中至少放置 10 min。从固定液中取出凝胶，用一张绷紧的膜覆盖在上并使其干燥。
12）在 -70℃ 中自显影过夜。大体来说，如果反应正常，用一台 900 型微型监测仪（Mini Instruments，Ltd.）应该可以在干燥的凝胶上于二甲苯青到达的位置上读到 50 cps 的读数。

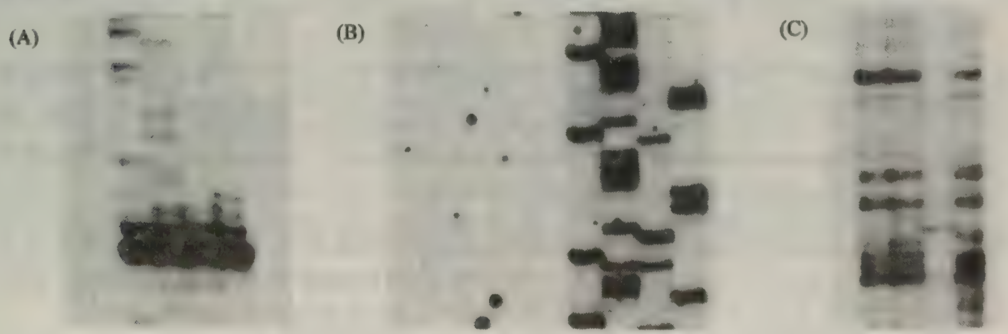


图 49.2 （A）在四条泳道上都出现条带。这很可能由于聚合酶遇到了模板上的二级结构而停止前进所造成。（B）测序凝胶上的斑点可能是末端标记引物降解所造成。左图表示极端的情况，这里引物已充分降解，因而不能进行测序反应。右图表示仍可读出序列的情况。（C）用末端标记的 PCR 引物而不是用巢式引物进行测序的结果。图中显示由于众多序列相重叠而使读序无法进行的情况。这是末端标记引物复性到许多非特异性 PCR 产物上所造成的结果。

图 49.1（A）所示的是一个典型的结果。关于一些可能发生的常见问题的讨论见注释 9~14（见图 49.2）。

4. 注　释

(1) 用这一方法测序时模板大小的限度大约是 2 kb，在使用大的模板时应注意改变模板的量，使模板-引物摩尔比保持不变。例如 1 pmol 250 bp 的模板相当于 150 ng，但 1.6 kb 的模板则是 1 μg。

(2) 可用[^{35}S]-γ-ATP 或[^{33}P]-γ-ATP 标记测序引物的末端。这种方法可增加胶顶部的解析度并减少对实验者的辐射。用[^{35}S]-γ-ATP 的末端标记反应需 4 h，信号强度减低意味着自显影可能要花几天时间。

(3) 测序引物不应含有任何可能形成二级结构的序列，不应含有较多连续的 G 残基，并且在 3′端无不正确配对。

(4) Sephadex G50 离心层析柱可以快速而简便地制备。将 Sephadex G50 加到 TE 溶液（pH 8.0）中，室温中放置过夜。用多聚毛绒塞住 1 ml 的一次性注射器，将 Sephadex G50 充满注射器，使 TE 流干（在离心前 Sephadex 应充填到注射器的顶端）。将注射管放置在 15 ml 的大离心管里（可用 15 ml 的 Falcon tube 2095），以 200 *g* 离心 3 min（台式离心机 1000 r/min）。柱中内容物应填充至 1 ml 体积，将样品装载到柱上后再一次离心（同一速度 3 min），用敞开的 Eppendorf 管收集样品。

(5) 用 50 μCi γ-ATP 标记 100 ng（15 pmol）寡核苷酸引物。这里没有必要干燥标记物，终反应体积保持在 10 μl，但多核苷酸激酶的量应减少到 1 μl（10 U）。

(6) 对大多数 PCR 产物 5 min 煮沸时间足够了，但在某些情况下，例如人的 DNA 和富含鸟嘌呤和胞嘧啶残基的 DNA，煮沸时间需长达 10 min 才能取得较好的变性效果。

(7) 将复性反应物立即放入冰水中很有必要，因为缓慢地冷却模板-引物混合物会导致模板链再次复性。

(8) 标记混合物作 8 倍稀释可使读序进行到接近引物 20 bp 处。在复性反应中加锰离子缓冲液（0.15 mol/L 异柠檬酸钠，0.1 mol/L $MnCl_2$）能使读序更接近引物。在 3.2 节步骤 4 中的复性后的引物-模板混合物中加入这一缓冲液 1 μl。读取远离引物的序列可能需要更浓的标记混合物。

(9) 条带缺失，但在胶的顶部出现一条强带，起因于链延伸而不终止，这可能是由于陈旧的终止混合物的分解或稀释不当所致。因此应配制新的溶液，如图 49.1（B）。

(10) 条带缺失，但在胶的底部出现一条强带，是引物不能与模板复性的结果，如图 49.1（C）。这种强带是游离的末端标记引物，可能由于模板的引物结合位置发生突变之故。可试用另一种引物。再一种解释是模板未能完全变性（见注释 6、7)。

(11) 条带微弱可能是（a）模板用量不足或（b）引物标记质量较差之故。后一种情况可能是因为γ-[^{33}P]ATP 放置时间过长或激酶反应效率不能达到所需的掺入量

(10^8 cpm/μg)。

(12) 二级结构可引起全部泳道中的序列过早终止，如图 49.2（A)。可用掺入核苷酸类似物的方法解决这一问题，例如将 dITP 或 7-deaza -2′dGTP[10] 加到测序混合物中，或用 *Taq* 聚合酶测序[11,12]。新近报道一种把 PCR 和末端标记引物测序[13]相结合的方法，这一方法可能将被证实是有价值的。

(13) 在一段短距离后，信号可能变得很弱以至不能阅读，这既可以是由于标记混合物太稀，也可以是由于终止混合物中双脱氧核苷酸浓度过高之故。

(14) 自显影图谱上的黑点，如图 49.2（B）常由于引物降解引起，可能发生在标记过程中。这不是一个严重问题，除非引物降解达到很严重的地步而使它不能引发测序反应。

参 考 文 献

1. Harwood, J., Tachibana, A., and Meuth, M. (1991) Multiple dispersed spontaneous mutations: a novel pathway of mutation in a malignant human cell line. *Mol. Cell Biol.* **11,** 3163–3170.
2. Phear, G. A., Armstrong, W., and Meuth, M. (1989) Molecular basis of spontaneous mutation at the *aprt* locus of hamster cells. *J. Mol. Biol.* **209,** 577–582.
3. Gibbs, R. A., Nguyen, P.-N., McBride, L. J., Koepf, S. M., and Caskey, C. T. (1989) Identification of mutations leading to the Lesch-Nyhan syndrome by automated DNA sequencing of *in vitro* amplified cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86,** 1919–1923.
4. Scharf, S. J., Horn, G. T., and Ehrlich, H. A. (1986) Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* **233,** 1076–1078.
5. Ward, M. A., Skandalis, A., Glickman, B. W., and Grosovsky, A. J. (1989) Rapid generation of a specific single-stranded template DNA from PCR-amplified material. *Nucleic Acids Res.* **20,** 8394.
6. Loh, E. Y., Elliott, J. F., Cwirla, S., Lanier, L. L., and Davis, M. M. (1989) Polymerase chain reaction with single-sided specificity: analysis of T cell receptor δ chain. *Science* **243,** 217.
7. Hultman, T., Stahl, S., Hornes, E., and Uhlen, M. (1989) Direct solid phase sequencing of genomic and plasmid DNA using magnetic beads as solid support. *Nucleic Acids Res.* **17 (13)** 4936,4937.
8. Wong, C., Dowling, C. E., Saiki, R. K., Higuchi, R. G., Ehrlich, H. A., and Kazazian, H. H. (1987) Characterisation of β-thalassemia mutations using direct genomic sequencing of amplified genomic DNA. *Nature* **330,** 384.
9. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74,** 5463–5467.
10. Barnes, W. M., Bevan, M., and Son, P. H. (1983) Kilo sequencing: creation of an ordered nest of asymmetric deletions across a large target sequence carried on phage M13. *Meth. Enzymol.* **101,** 98–122.
11. Innis, M. A., Myambo, K. B., Gelfand, D. H., and Brow, M. A. D. (1988) DNA sequencing with *Thermus aquaticus* polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85,** 9436–9440.
12. Peterson, G. (1988) DNA sequencing using Taq polymerase. *Nucleic Acids Res.* **22,** 10,915.
13. Ruano, G. and Kidd, K. K. (1991) Coupled amplification and sequencing of genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88,** 2815–2819.

第五十章　应用热循环-双脱氧法进行 DNA 测序

Barton E. Slatko

1. 引　　言

许多实验室中 DNA 测序已经很快成为日常工作的一部分，多种不同的新的克隆载体、测序策略和技术已经发展起来，以便更有效地测定各种 DNA 模板。尽管目前关注的焦点主要在自动 DNA 测序方面，但在自动化测序方法广泛应用之前，仍然须用其他方法。最近在人工测序方面又增加了一种新的方法，称作热循环测序。

热循环测序方法的基础是 Sanger 等的双脱氧核苷酸链终止法[1]。在这一反应中一个合适的引物 DNA 分子与互补的一段 DNA 单链进行复性，将这一引物模板复合物和耐热 DNA 聚合酶一起保温，所用的耐热酶是 *Thermococcus litoralis* 的外切核酸酶活性缺陷的 DNA 聚合酶、$Vent_R$™（exo^-）DNA 聚合酶[2,3]或是 *Thermus aquaticus*（*Taq*）聚合酶[4~7]，此外加入三磷酸脱氧核苷（dNTPs）和三磷酸双脱氧核苷（ddNTPs）。四种分开的反应混合物，(每一反应混合物中含有四种 dNTPs 和四种 ddNTPs 中的一种）经保温产生四套不同长度的片段，每套终止在一特定核苷酸残基位置。加过量引物、$Vent_R$™ DNA 聚合酶、dNTPs 和 ddNTPs，从少量的模板分子经重复变性复性和链延伸反应，可获得反应产物的线性扩增及较强的测序信号（图 50.1）。在每一循环中，反应温度升高到 95℃ 使双链模板或单链 DNA 模板的二级结构变性，降低到 55℃ 以使模板与引物复性，然后将温度升高到 72℃ 进行 DNA 链的延伸反应。然后变性、复性、延伸反

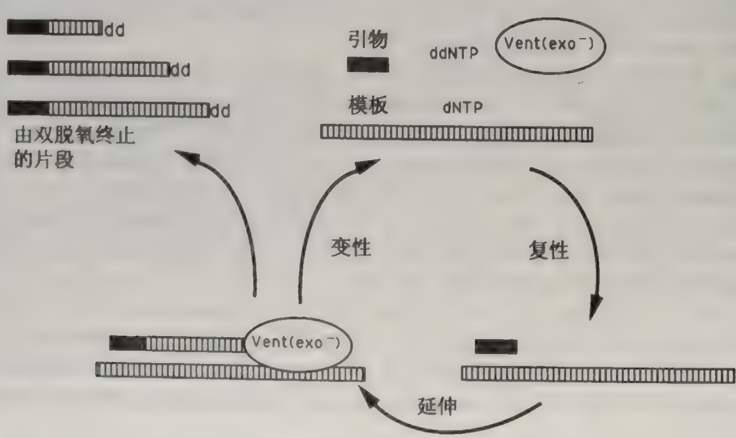


图 50.1　热循环测序反应示意图，表明通过复性、延伸和变性等步骤形成双脱氧-终止的 DNA 片段。本图的翻印得到 New England Biolabs, Inc. 的同意。

复进行，在这些反应中过量的引物像第一次循环那样一再与同一变性模板复性。

热循环测序有几个优点超过以前的测序技术[4~8]。

①反应快速，操作简便并且效率高，在自动 DNA 测序和手工测序中同样有用。

②由于标记产物的线性扩增，较标准方法须用模板量少。

③开始测序反应前并无必要将 DNA 模板变性。

④在以后各次反应前不须另行复性。

⑤应用耐热 DNA 测序酶使测序反应可在高温条件下进行，有利于获得具有大量二级结构的 DNA 模板的信息，而低温度的测序方法便难于对付这种情况。

这一方法可用于单链 DNA 的测序，如来自 M13、fl、fd 噬菌体的、或从噬粒载体获得的 DNA，或用于双链 DNA 模板，如质粒 DNA 或 PCR 扩增产物，或大的线性双链 DNA，如噬菌体 λ 的 DNA。另外，也可以用这一方法对噬菌斑或细菌菌落作直接测序[8~10]。

为了观察胶上的双脱氧终止链，已发展了多种标记的方法。通常，通过在反应混合物中加入 α-标记的三磷酸脱氧核苷而使^{32}P、^{33}P、^{35}S 掺入到新生链里。在另外一种方法中，利用 T4 多核苷酸激酶将 rATP 上的γ-[^{32}P]或 γ-[^{33}P]转移到引物的 5′端。类似地，引物经修饰可用于化学荧光发光测序[11]，或将荧光染料做末端标记用于自动测序[8,12]。在使用少量模板 DNA 的情况下，5′端标记^{32}P 或^{33}P 可用于热循环测序（见 3.2 节)。5′端标记的引物也可用于较大模板（例如 λgtⅡ）的测序，或者在用掺入标记技术时只能取得不太满意结果的模板的测序中。

测序反应产物，即长度不同的 DNA 链，可用变性聚丙烯酰胺凝胶分开，如果使用放射性同位素或非放射性的化学荧光发光物标记 DNA 分子，凝胶可经处理后进行 X 射线底片曝光。所取得的自显影谱为测序分析提供资料。如果用自动 DNA 测序仪，资料收集可随时进行而不须要对凝胶作后加工处理。

本章提供一套通过 5′端标记引物（^{32}P、^{33}P、或经修改后用于荧光探测）或用^{35}S、^{32}P、^{33}P［dATP］放射性元素掺入来测定毫微量级的单链或双链 DNA 模板序列的热循环测序方法。

2. 材　　料

1）10 × $Vent_R^{TM}$（exo^-）DNA 聚合酶测序缓冲液：100 mmol/L（NH_4）$_2SO_4$，100 mmol/L KCl，200 mmol/L Tris-HCl，50 mmol/L $MgSO_4$、pH 8.8（室温）。－20℃保存。

2）$Vent_R^{TM}$（exo^-）DNA 聚合酶脱氧/双脱氧测序混合物：用 1 × $Vent_R^{TM}$（exo^-）DNA 聚合酶测序缓冲液配制（参见注释 1)。

	A 混合液	C 混合液	G 混合液	T 混合液
	μmol/L 浓度			
ddATP	900	–	–	–
ddCTP	–	400	–	–
ddGTP	–	–	360	–
ddTTP	–	–	–	720
dATP	30	30	30	30
dCTP	100	37	100	100
dGTP	100	100	37	100
dTTP	100	100	100	33

-20℃保存。

3）30×Triton X-100：3% Triton X-100，-20℃保存。

4）放射性标记：(参见注释 2)。如 3.1 节所述，用 α-[^{35}S]-dATP, 500 Ci/mmol; α-[^{32}P]-dATP, 400 Ci/mmol, 或 α-[^{33}P]-dATP, 3000 Ci/mmol 标记 dATP。用 3000 Ci/mmol γ-[^{32}P]-rATP 或 3000 Ci/mmol γ-[^{33}P]-rATP 作引物末端标记（如 3.2 节所描述）。-20℃保存。

5）$Vent_R^{TM}$（exo$^-$）DNA 聚合酶：2 U/μl（New England Biolabs, Inc., Beverly, MA)。于-20℃保存。

6）终止/上样染料液：含 0.3%二甲苯青 FF、0.3%溴酚蓝和 0.37% EDTA（pH 7.0）的去离子甲酰胺溶液。-20℃保存。

3. 方　　法

3.1　用标记的 dATP 掺入作热循环测序

1）将四个微型离心管分别标上 A 、C、G、T。把 $Vent_R^{TM}$(exo$^-$)DNA 聚合酶脱氧/双脱氧测序混合液 A、C、G、T 各3 μl 分别加入 A、C、G、T 管的底部。

2）将下列成分混合在一个 0.5 ml 微型离心管中：0.04 pmol 单链模板 DNA 或 0.1 pmol 双链模板 DNA（参见注释 3 和 4)、0.6 pmol 单链模板的引物或 1.2 pmol 双链模板的引物、1.5 μl 10×$Vent_R^{TM}$（exo$^-$）DNA 测序缓冲液、1 μl 30×Triton X-100 溶液用蒸馏水加到总体积为 12.0 μl。用吸管轻轻吹吸混匀。

3）用上述方法逐一处理全部引物和模板试管，全部处理完毕后前进到第四步操作。在含模板、引物、缓冲液、Triton X-100 和水的离心管内加 2 μl 放射标性记物。再加 2～4 U $Vent_R^{TM}$（exo$^-$）DNA 聚合酶，轻轻吹吸混匀液体。立即将 3.2 μl 混匀液体放进标以 A 的脱氧/双脱氧管，轻轻吹吸混匀。重复该步骤分别加到 C、G 和 T 管，每次更换吸嘴。

4）每管加一滴灭菌矿物油，将试管放进已设置好反应时间和温度的热循环仪（参见注释 5)。启动热循环仪。

5）加热周期完成后，将 4 μl 终止/上样染料液加到每管的矿物油层的下面，至此全部反应

完成，随时可在适当的变性凝胶上作电泳（参见注释 6）。反应物可在 -20℃ 保存。

3.2 用 5′端标记的引物作热循环测序

1）将四个微型离心管标上 A、C、G 和 T 字样。把 3 μl $Vent_R^{TM}$（exo^-）DNA 聚合酶脱氧/双脱氧测序混合物 A 加到 A 管底部，同样分别加 3 μl C、G 和 T 混合物到 C、G、T 各管底部。

2）在一个 0.5 ml 微型离心管中将下述液体混合在一起：0.004 pmol 单链模板 DNA 或 0.01 pmol 双链 DNA 模板（参见注释 3、4 和 7）、0.6 pmol 单链 DNA 模板的末端标记引物或 1.2 pmol 双链 DNA 模板的末端标记引物（参见注释 8）、1.5 μl 10× $Vent_R^{TM}$（exo^-）DNA 聚合酶测序缓冲液、1 μl 30× Triton X-100 溶液，用蒸馏水加至总体积为 14.0 μl。轻轻吹吸混匀。

3）对每一模板/引物离心管逐个操作，待全部完成后，进入第四步。取 2～4 U $Vent_R^{TM}$（exo^-）DNA 聚合酶加入含有模板、引物、缓冲液、Triton X-100 和水的管中，轻轻吹吸混匀溶液，立即取 3.2 μl 加到标 A 字样的离心管中，轻轻吹吸混匀液体。重复该步骤分别加到 C、G 和 T 管中，每一次更换吸嘴。

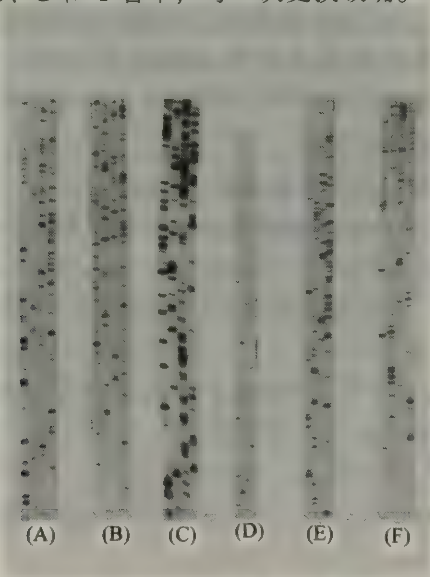


图 50.2 $Vent_R^{TM}$（exo^-）DNA 聚合酶热循环测序反应自显影谱，叙述见正文。（A）用 ^{32}P 5′端标记（经激酶作用）的 M13 前向测序引物（NEB，New England Biolabs，Inc. #1224），从含有 pUC19 双链质粒 DNA 的菌落直接获得的测序结果；（B）用 ^{32}P 5′端标记（经激酶作用）的 M13 前向引物（NEB #1224），从一个 M13mp18 噬菌斑得到的 DNA 的直接测序结果；（C）用 ^{32}P 5′端标记（经激酶作用）的 20-mer 引物，从 0.01 pmol PCR 双链模板获得的 DNA 测序结果；（D）用 M13 前向通用引物（NEB #1224）和 α-[^{35}S]dATP 掺入法，从 0.004 pmol（10 ng）M13mp18 单链 DNA 模板得到的 DNA 测序结果；（E）用 M13 前向通用引物（NEB #1224）和 α-[^{35}S]dATP 掺入法，从 0.01 pmol（20 ng）pUC19 双链 DNA 模板（NEB#304-1）得到的 DNA 测序结果；（F）用 ^{32}P 5′端标记引物从微量制备的黏粒双链 DNA 模板得到的测序结果；全部轨道的上样都是从左到右：G、C、A、T。除（D）和（E）曝光为 36 h 外，其余样品曝光过夜，未用增感屏。

4）用一滴灭菌矿物油覆盖每一离心管。设置好反应时间和温度（参见注释 5），将加样完毕的离心管放在热循环仪上。启动热循环仪。

5）完成预定循环后，加 4 μl 上样/ 终止染料液到矿物油下面，至此，反应已完成，随时可在适当的变性凝胶上进行电泳（参见注释 6）。反应物可在 −20℃ 保存。

图 50.2 所示为一组典型的结果。可能发生的问题在注释 9 和 10 中有叙述。

4. 注　　释

（1）可用等摩尔浓度的 7-deaza dGTP（7-deaza-2′-脱氧鸟苷-5′-三磷酸）代替三磷酸脱氧鸟苷或用等摩尔浓度的 7-deaza dATP 代替三磷酸脱氧腺苷以改进对二级结构含量高的区域的测序。但不推荐用 dITP（2′-脱氧肌苷-5′-三磷酸）替代三磷酸脱氧鸟苷，因为它的掺入效率不高，而且因为在所有四条轨道上都倾向于显示浅的条带（过早终止）。

（2）少量 DNA 模板（0.004～0.01 pmol）的测序或直接由菌落或噬菌斑测序，应使用 ^{35}S 或 ^{32}P 末端标记引物。所有其他测序方法，包括 PCR 产物测序，^{35}S、^{32}P 和 ^{33}P 均可被有效地利用。由于 ^{35}S 在激酶反应中掺入效率较低，不推荐用于少量 DNA 模板的测序。如果用激酶反应制备末端标记引物，推荐用较高比活（3000 Ci/mmol)的 rATP，因为它能提供较强的信号。全部实验操作中，放射性物质应在不超过两个半衰期的时间内使用。

（3）使用下述模板和制备物可得到较好结果

a. 质粒模板的纯化应用 CsCl 梯度离心法、标准微量制备方法[13]、微量柱层析或更新的方法，例如 Insta-Prep™（5 prime→3 prime，Inc.，Boulder，CO）。

b. 应以 PEG 沉淀法[13]或固相支持法[14]纯化单链 M13 模板。

c. λ（λgt10，11 等）和黏粒模板应用 CsCl 梯度离心或微量制备方法纯化[13]。

d. PCR 反应完成后，一定要将双链或单链 PCR 产物中遗留的过量引物和核苷酸去除掉。用酚/ 氯仿提取及用酒精沉淀 PCR 反应产物，以 50 μl 蒸馏水重悬干燥的沉淀。用 PVDF 膜（0.025 μ）（Millipore Corp.，Bedford，MA）点滴透析反应产物（1 h，用 200 ml 水）[15]，或用凝胶纯化、玻璃珠法或排出法（即离心柱法）纯化产物。

e. 用菌落直接测序[8,10]时将菌落悬浮在 12 μl 新配置的菌落/噬菌斑裂解液[10]中（pH 7.5 的 10 mmol/L Tris-HCl、1 mmol/L EDTA、50 mg/ml 蛋白激酶 K；每次用新鲜配制的溶液。蛋白激酶 K 母液可以配好后分装，于 −20℃ 保存）。短暂涡旋振荡溶液，55 ℃ 保温 15 min，然后 80 ℃ 保温 15 min，冰上放置 1 min 后在微型离心机上离心 3 min。取 9 μl 上清液作为测序反应末端标记引物的模板用。

f. 对 M13 或 λ 噬菌斑作直接测序[8～10]时用牙签挑取琼脂表面的噬菌斑放入 1.5 ml 离心管里，其中含有新鲜制备的菌落/噬菌斑裂解液 12 μl（10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，1 mmol/L EDTA，50 mg/ml 蛋白激 K；每次用新鲜配制的溶液，蛋白酶母液可配制好并分装后 −20℃ 中保藏）。短暂涡旋振荡后 55℃ 保温 15 min，然

后 80℃ 中保温 15 min，置冰上 1 min，在微型离心机中离心 3 min，取 9 μl 上清液作为末端标记引物的模板。

(4) 摩尔比的计算：下列公式可用作引物或模板量（pmol）的计算：
单链 DNA（M13 噬菌体、单链 PCR 产物、寡核苷酸引物等。）*

$$\# \text{pmol} = (\# \mu g \text{ DNA} \times 10^6 \text{ pg}/\mu g)/(\# \text{ 碱基数} \times 330 \text{ pg/pmol})$$

双链 DNA（双链 PCR 产物、质粒、λ DNA、限制酶切片段等。）**

$$\# \text{pmol} = (\# \mu g \text{ DNA} \times 10^6 \text{ pg}/\mu g)/(\# \text{ 碱基对} \times 660 \text{ pg/pmol 碱基对})$$

$* 40\ \mu g = 1\ OD_{260}$；$\# \mu g$ 寡核苷酸 $= \# OD_{260} \times 40\ \mu g/OD_{260}$

$** 50\ \mu g = 1\ OD_{260}$；$\# \mu g$ 寡核苷酸 $= \# OD_{260} \times 50\ \mu g/OD_{260}$

一些有用的数字：

0.04 pmol 7.25 kb 单链 DNA 模板 = ～100 ng
0.004 pmol 7.25 kb 单链 DNA 模板 = ～10 ng
0.1 pmol 3 kb 双链 DNA 模板 = ～200 ng
0.01 pmol 3 kb 双链 DNA 模板 = ～20 ng

(5) 热循环参数：对大多数热循环仪，包括 Techne（Duxford，UK）PHC-2 和 Perkin-Elmer-Cetus（Norwalk，CT）480 热循环仪，使用 20 次循环：

95℃	20 s
55℃	20 s
72℃	20 s

可以改变循环条件而仍保持良好效果。可以减少反应循环次数，尤其是当模板 DNA 量超过操作指南所推荐的用量时。不过进行少量 DNA 样品的测序时，循环次数超过 30 次往往效果不好，在所得到的自显影谱上，这种操作常常会增加浅的条带。变更循环反应的时间和/或温度也是可行的。模板测序可只用两步：95℃ 变性加 72℃ 复性和延伸步骤，所使用的引物的表观解链温度（T_m）可低至 55℃。这一方法所获得的信号的强度可能较标准的三步法要弱。降低复性及延伸温度到引物的 T_m 而进行包括两个步骤的测序循环也是可行的。例如，采用 95℃ 变性温度和 55℃ 复性和延伸温度。如果在标准三步法中得到的测序信号较弱，复性温度对于所用引物来讲可能太高了。复性温度可以降低到相应于个别引物的 T_m。要成功地使用某些热循环仪，可能需要较长的反应时间（在每一循环中，每一步从 20 s 增加到 1 min）。

(6) 反应结束后在微型离心机上作短暂离心（5 s）有助于确保完全将油层与水层分开，在测序胶上临加样前将反应物在 80℃ 中加热 2 min。每一次加样，将吸管插入覆盖的油层下面，吸出 2.5 μl 样品。加样前为了去除吸嘴上残留油物，或许有必要将吸嘴稍事接触卷筒纸。也可用硅油覆盖在上，接着将反应物从油中沉淀[16]，或用 Parafilm™ 去除油层[17]。另一种方法是用“热盖”装置，将温度定在高出热循环仪中最高温度 15℃（～115℃），这样可以避免蒸发并使反应过程中不须加油。应该指出的是，我们从来没有经历过由于覆盖油层而带来测序胶中出现不正常条带的情况。

(7) 多达 10 倍量的 DNA 模板可用于本测序方法中。

(8) 对于γ-[^{32}P]或 γ- [^{33}P]rATP 末端标记，可用下述方法：

a. 在一个 0.5 ml 微型离心管中混合下述物质：13.5 μl 水，2.5 μl 10×T4 多核苷酸激酶缓冲液（10×缓冲液＝500 mmol/L Tris-HCl、pH 7.6，100 mmol/L $MgCl_2$，50 mmol/L DTT），10.5 pmol 引物（1 μl 引物母液；母液＝2.5 μg 24-mer 引物悬浮在 30 μl 水中），7 μl γ-[^{32}P]rATP（11.5 pmol），1 μl（10 U）T4 多核苷酸激酶（10 000 U/ml）。

b.37℃中反应 30 min。

c. 在 95℃终止反应 5 min，室温中在微型离心机上作短暂离心，－20℃中贮存。这一方法可在 25 μl 反应体系中提供 10.5 pmol 的 5′端标记引物，这样得来的引物最终浓度为 0.4 pmol/μl。

(9) 下述测序特点为 $Vent_R^{TM}$（exo^-）DNA 聚合酶所特有：

a. 若干个连续的 C 中的第一个 C 比其后的 C 带较深。

b. 若干个连续的 A 中第二个 A 比前一个（和/或后面的）A 带较深。

c. 紧接着 A 带的 G 倾向于比其他 G 带较深。

d. 紧接着 A 带的 T 带倾向于比其他 T 带较深。

(10)如果 DNA 测序结果不那么满意，有几个因素可以考虑。问题往往出在模板的制备上。用酚/氯仿抽提或酒精沉淀后接着用 70％酒精淋洗常常可解决这一问题；第二个问题是在反应中引物和/或模板用量过多或过少；这里所介绍的以 pmol 计的量是由经验得来的最佳用量。

另一个可能的问题是热循环仪的欠恰当的操作。某些热循环仪或许需要较长的反应时间，因而会带来问题。这里往往呈现为一条或两条轨道上的条带比其他轨道上的条带较浅或者一条轨道上条带全缺。这些现象说明热循环仪可能存在问题。

参 考 文 献

1. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74,** 5463–5467.
2. Kong, H., Kucera, R., and Jack, W. (1992) Characterization of a DNA polymerase from the hyperthermophile Archaea *Thermococcus litoralis*. *J. Biol. Chem.* **268,** 1965–1975.
3. Perler, F., Comb, D., Jack, W., Moran, L., Qiang, B.-Q., Kucera, R., Benner, J., Slatko, B., Nwankwo, D., Hempstead, K., Carlow, C., and Jannasch, H. (1991) Novel intervening sequences in an Archaea DNA polymerase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89,** 5577–5581.
4. Adams, S. and Blakesley, R. (1991) Linear amplification sequencing. *Focus (BRL)* **13(2),** 56–57.
5. Carothers, A. M., Urlaub, G., Mucha, J., Grunberger, D., and Chasin, L. A. (1989) Point mutation analysis in a mammalian gene: rapid preparation of total RNA, PCR amplification of cDNA and *Taq* sequencing by a novel method.

BioTechniques **7,** 494–499.
6. Craxton, M. (1991) Linear amplification sequencing: a powerful method for sequencing DNA. *Methods*, a companion to *Meth. Enzymol.* **3,** 20–26.
7. Murray, V. (1989) Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.* **17,** 8889.
8. Sears, L. E., Moran, L. S., Kissinger, C., Creasey, T., Sutherland, E., Perry-O'Keefe, H., Roskey, M., and Slatko, B. (1992) Thermal cycle sequencing and alternative manual and automated DNA sequencing protocols using the highly thermostable $Vent_R$™ (exo^-) DNA polymerase. *BioTechniques* **13,** 626–633.
9. Krishnan, B. R., Blakesly, R. W., and Berg, D. E. (1991) Linear amplification DNA sequencing directly from single phage plaques and bacterial colonies. *Nucleic Acids Res.* **19,** 1153.
10. Young, A. and Blakesley, R. (1991) Sequencing plasmids from single colonies with the dsDNA cycle sequencing system. *Focus (BRL)* **13(4),** 137.
11. Creasey, A., D'Angio, L., Dunne, T. S., Kissinger, C., O'Keeffe, T., Perry-O'Keefe, H., Moran, L. S., Roskey, M., Schildkraut, I., Sears, L. E., and Slatko, B. (1991) Application of a novel chemiluminescence-based DNA detection method to single-vector and multiplex DNA sequencing. *BioTechniques* **11,** 102–109.
12. *Biosystems Reporter* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) (1991) **13,** 1–2.
13. Slatko, B., Heinrich, P., Nixon, B. T., and Eckert, R. (1991) Preparation of templates for DNA sequencing unit 7.3, in *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, F., Brent, R., Kingston, R., Moore, D., Seidman, J., Smith, J., and Struhl, K., eds.), Wiley, New York.
14. Hultman, T., Bergh, S., Moks, T., and Uhlen, M. (1991) Bidirectional solid phase sequencing of in vitro amplified plasmid DNA. *BioTechniques* **10,** 84–93.
15. Silhavy, T., Berman, M., and Enquist, L. (1984) *Experiments With Gene Fusions.* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
16. Ross, J. and Leavitt, S. (1991) Improved sample recovery in thermocycle sequencing protocols. *BioTechniques* **11,** 618–619.
17. Whitehouse, E. and Spears, T. (1991) A simple method for removing oil from cycle sequencing reactions. *BioTechniques* **11,** 616–618.

第五十一章　自动 DNA 测序仪的使用

Zijin Du, Richard K. Wilson

1. 引　　言

由于荧光标记双脱氧核苷酸测序化学以及在凝胶电泳中荧光标记 DNA 实时检测仪的发展[1~6]，使大规模 DNA 测序计划的完成效率大增。除了避免使用放射性同位素外，这些系统可使读序自动化，从而提供能直接分析的或是可输入序列收集装置的计算机可读数据。在本章中我们将介绍第一台商品化的 DNA 测序仪——373A 型自动测序仪，由 Applied Biosystems, Inc. 公司所开发。此种测序仪最初在 1987 年以 370A 型出现，它利用"四色同道"技术使测序胶中的每一道都可检测到四种不同的荧光[6]。在 DNA 测序反应中掺入四种标记物，它们可能出现在测序引物的 5′端（"染料-引物"标记）或在三磷酸双脱氧核苷上（"染料-末端"标记)。由于对每一样品 373A 只需要一条泳道，每次电泳最多可分析 36 个样品。相比之下，Pharmacia ALF 测序仪仅利用单色荧光、四条泳道引物标记技术，每次电泳最多只能分析 10 个样品。373A 型测序仪的这种既可用引物标记又可用末端标记的能力使得须用鸟枪法和用引物介导测序的工作更趋于高效。

我们曾用 373A 仪对 M13、质粒和噬粒亚克隆以及 PCR 产物模板 DNA 作测序分析。这里介绍一种用经改造的 T7 DNA 聚合酶和荧光-染料引物对单链 M13 和质粒 DNA 进行测序的方法。这里描述的第二种测序方法用 *Taq* T7 DNA 聚合酶和热循环仪，并且也适用于染料-引物和单链或双链模板。在第三种测序方法中利用 T7 聚合酶和荧光染料末端标记，可被用于单链 M13 和噬粒 DNA 的测序。这第三种方法须在 373A 中安装特殊硬件。另一种用 *Taq* DNA 聚合酶的染料-末端标记方法由 Applied Biosystems 所提供，不过在我们实验室里这一方法尚不成熟，因此不在本章叙述。

2. 材　　料

1）线性扩增测序和 PCR 模板制备中都须用 PCR 仪（参见注释 1)。我们实验室用 GeneAmp 9600 热循环仪（Pekin-Elmer, Norwalk, CT）和 PTC-200 热循环仪（MJ Research, Boston, MA)，工作性能都很好。两种仪器均配备有 96 孔的微量反应板，有明显较快的启动时间，且有一加热盖，消除了用矿物油作覆盖的弊病。Techne MW-1 热循环仪在利用 96 孔微量反应板的线性扩增测序反应中也有较好的工作性能（M. Craxton, 个人通讯)。

2）这里描述的自动荧光测序系统为 Applied Biosystems, Inc.（Foster City, CA）的 373A 型，现有型号的 Macintosh IIci 计算机配备有 8 MB RAM 和 100 MB 硬盘。

3）*Thermus aquaticus*（*Taq*）DNA 聚合酶可从几家公司之一购置。按我们的经验 Epicentre 公司（Madison，WI）的 Sequi-therm 酶可得到最好结果。

4）经改造的 T7 DNA 聚合酶（测序酶）应从 United States Biochemical（Cleveland，OH）购买；Version 1.0 用于染料-引物标记测序效果最佳；Version 2.0 含有焦磷酸酯酶，为染料-末端标记测序所首选。

5）脱氧核苷酸（dNTPs）和双脱氧核苷酸（ddNTPs）：

a. 母液：100 mmol/L dNTP 和 5 mmol/L ddNTPs 溶液可从 Pharmacia（Piscataway，NJ）购得，以 TE 缓冲液配制含每一种 dNTP 20 mmol/L 的母液，－20℃保存。

b. 用于 PCR：用 TE 缓冲液制备含每一种 dNTP 1.25 mmol/L 的溶液，－20℃保存。

c. 利用经改造的 T7 DNA 聚合酶作染料-引物标记测序：

i. 配制 8 mmol/L dNTP 混合物：用 TE 缓冲液配制 100 mmol/L dATP，dCTP，dGTP，dTTP 各 100 μl，最终体积为 1.25 ml（－20℃贮存）。

ii. 配制 50 μmol/L ddNTP 溶液：

ddA：2 μl 5 mmol/L ddATP + 198 μl TE 缓冲液
ddC：2 μl 5 mmol/L ddCTP + 198 μl TE 缓冲液
ddG：4 μl 5 mmol/L ddGTP + 396 μl TE 缓冲液
ddT：4 μl 5 mmol/L ddTTP + 396 μl TE 缓冲液

iii. 测序混合物：混合等体积的 8 mmol/L dNTP 混合物和四种 50 μmol/L ddNTP 中的一种。足够 100 次反应用，配制 100 μl A 和 C 混合液以及 200 μl G 和 T 混合液。

d. 用于线性扩增的染料-引物标记测序：

i. 配制 dNTP 母液（足够 200 次反应）（参见注释 2）：

dATP 混合液：1.25 μl 20 mmol/L dATP，20 mmol/L dCTP，dGTP，dTTP 各 5.0 μl，184.75 μl TE

dCTP 混合液：1.25 μl 20 mmol/L dCTP，20 mmol/L dATP，dGTP，dTTP 各 5.0 μl，184.75 μl TE

dGTP 混合液：2.50 μl 20 mmol/L dGTP，20 mmol/L dATP，dCTP，dTTP 各 10.0 μl，367.50 μl TE

dTTP 混合液：2.50 μl 20 mmol/L dTTP，20 mmol/L dATP，dCTP，dGTP 各 10.0 μl，367.50 μl TE

ii. 配制 ddNTP 溶液（足够 167 次反应）：

ddATP（3.0 mmol/L）：100 μl 5 mmol/L ddATP + 67 μl TE
ddCTP（1.5 mmol/L）：50 μl 5 mmol/L ddCTP + 117 μl TE
ddGTP（0.25 mmol/L）：16.7 μl 5 mmol/L ddGTP + 317.3 μl TE
ddTTP（2.5 mmol/L）：167 μl 5 mmol/L ddTTP + 167 μl TE

iii. 配制 dNTP / ddNTP 工作液（足够 100 次反应）：

50 μl dATP 混合液 + 50 μl 3.0 mmol/L ddATP
50 μl dCTP 混合液 + 50 μl 1.5 mmol/L ddCTP
100 μl dGTP 混合液 + 100 μl 0.25 mmol/L ddGTP

100 μl dTTP 混合液 + 100 μl 2.5 mmol/L ddTTP

e. 用经改造的 T7 DNA 聚合酶作染料-末端标记测序：

i. 2 mmol/L [αS]dNTPs，10 mmol/L Tris-HCl、pH 7.2，0.1 mmol/L EDTA

ii. ZL 1.1.1.2 染料-末端标记混合液：2.2 μmol/L ddT－6fam，9.0 μmol/L ddC-5zoe，6.0 μmol/L ddA-lou，16.0 μmol/L ddG-nan（可从 ABI 购得；－20℃贮存）。

6）寡核苷酸染料-引物：对于 M13 和噬粒的测序，通用的、反向的 T7 和 SP6 引物可从 Applied Biosystems 购得。这些引物序列为：（－21 M13）5′TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT 3′，（M13RP1）5′CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC 3′（参见注释 3）。

7）40% A & B 液：380 g 丙烯酰胺，20 g 双丙烯酰胺，加蒸馏水到 1 L，加入 Amberlite MB-1（50 g/L）后搅拌 1 h 以去离子，过滤，用不透明瓶 4℃中保存。

8）20×TBE 缓冲液：324 g Tris 碱，55 g 硼酸，18.6 g EDTA，加蒸馏水到 1 L。

9）15%过硫酸铵。

10）5×*Hin* d/DTT（+ Mn^{2+}；新鲜配制）

a. 50 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，300 mmol/L NaCl，5 mmol/L DTT。

b. 临测序前将 3 μl 1 mol/L $MnCl_2$ 加到 197 μl 5×*Hin* d/DTT 缓冲液中。

11）5 mol/L 醋酸铵、pH 7.4。

12）5×LASR 缓冲液：400 mmol/L Tris-HCl、pH 8.9，100 mmol/L $(NH_4)_2SO_4$，25 mmol/L $MgCl_2$。

13）10×Mn^{2+}缓冲液：50 mmol/L $MnCl_2$，150 mmol/L 异柠檬酸钠。

14）10×MOPS 缓冲液：400 mmol/L MOPS、pH 7.5，500 mmol/L NaCl，100 mmol/L $MgCl_2$。

15）9.5 mol/L 醋酸铵、pH 7.4。

3. 方　　法

3.1 DNA 测序反应

3.1.1 应用荧光染料标记引物的 T7/mT7 DNA 聚合酶测序法

在本方法中正像在荧光染料引物测序[9]中那样，使用经改造的 T7 DNA 聚合酶[7,8]作测序。用 96 孔 U 形底的微量反应板（Falcon，Becton Dickinson Co.，Rutherford，NJ，No. 3911）便于进行操作，既可用手工也可用自动加样装置[10]。由于 G 和 T 反应中荧光染料产生的反应信号较弱，反应体积应加倍。

1）复性反应按下表加液：

	A	C	G	T
5×*Hin* d/DTT（+ Mn^{2+}；临用前配制）	1 μl	1 μl	2 μl	2 μl
模板 DNA	3 μl	3 μl	6 μl	6 μl
每种染料引物（0.4 pmol/μl）	1 μl	1 μl	2 μl	2 μl

反应物加热到 55℃，3～5 min 后缓慢冷却到室温 10～15 min。如果反应在 96 孔板中进行，干的加热块可加以改进使 96 孔得以均匀加热[11,12]。

2）每一复性反应中加：

	A	C	G	T
8 mmol/L dNTPs ＋ 50 μmol/L ddXTP 混合液	2 μl	2 μl	4 μl	4 μl
经改造的 T7 DNA 聚合酶（1.5 U/μl）	1.5 μl	1.5 μl	3 μl	3 μl

四种反应均在 37℃ 保温 5～10 min。

3）延伸和终止反应后，在将它们混合并浓缩作电泳前四种反应必须停止。简单的停止方法是在 1.5 ml 离心管（每一模板用一管）中加 6 μl 5 mol/L 醋酸铵（pH 7.4），120 μl 95% 乙醇。对每一组模板，将 8 μl A 反应液转移到管中，上下快速往返吹吸两次以淋洗吸嘴并使样品与乙醇溶液混合，不换吸嘴将 8 μl 的 C 和 16 μl 的 G 和 T 加入管内，每加一反应液后上下吹吸。乙醇能有效终止酶的进一步作用。每一套模板重复这一操作。将混合在一起的反应液放在 −20℃ 中 30 min 以沉淀 DNA 产物。

4）在室温中以 13 000 *g* 离心 15 min 以收集 DNA，用 300 μl 70% 乙醇在室温中洗涤一次，真空中稍事干燥。干燥的样品可在 −20℃ 放置几天。

3.1.2 应用荧光染料引物的线性扩增测序法（*Taq* DNA 聚合酶）

1）测序反应在 0.5 ml 离心管或 0.2 ml Micro-Amp™管中进行，各管含下述成分：

	A	C	G	T
5×LASR 缓冲液	1 μl	1 μl	2 μl	2 μl
dNTP/ddXTP 混合液	1 μl	1 μl	2 μl	2 μl
每种染料引物（0.4 pmol/μl）	1 μl	1 μl	2 μl	2 μl
模板 DNA（约 250 ng/μl）	1 μl	1 μl	2 μl	2 μl
Taq DNA 聚合酶（0.7 U/μl）	1 μl	1 μl	2 μl	2 μL
总体积	5 μl	5 μl	10 μl	10 μl

2）如有必要，用 50 μl 轻矿物油覆盖反应液。热循环仪预热到 95℃，样品放在预热的金属板块上，使用 Perkin-Elmer 的热循环仪以下述参数进行热循环（参见注释 4）：

DNA 热循环仪	9600 热循环仪
95℃ 30 s	95℃ 4 s
55℃ 30 s	55℃ 10 s
70℃ 60 s	70℃ 60 s
15 次循环后	15 次循环后
95℃ 30 s	95℃ 4 s
70℃ 60 s	70℃ 60 s
再进行 15 次循环	再进行 15 次循环

循环结束后样品保存在4℃中。

3）正如有关经改造的 T7 DNA 聚合酶反应中所叙述的那样，四种测序反应必须在混合并浓缩前终止以备作电泳。终止反应的一种简便的方法是将每一反应物转移到一含有醋酸铵/乙醇溶液的 1.5 ml 微型离心管中，经乙醇沉淀后干燥样品可在 −20℃贮存几天。

3.1.3 应用荧光染料末端的 mT7 DNA 聚合酶测序法

这一方法须在 373A DNA 测序仪上装备特殊的五色（531/545/560/580/610）滤色轮，测序反应中的单链 DNA 来自 M13 或噬粒。

1）每一样品在一个 1.5 ml 微型离心管中加下列复性反应液：2 μl 10× Mn^{2+} 缓冲液，2 μl 10×MOPS缓冲液，x μl ssDNA（2.5 μg），0.5 μl 引物（3.2 pmol/μl），加 y μl ddH_2O，总体积 11 μl。

2）55℃保温 5 min，然后冷却至室温后放置 7 min。短暂离心收集沉淀。

3）复性反应液中加入下述试剂：4 μl 2 mmol/L [αS] dNTPs，4 μl ZL 1.1.1.2 染料-末端混合液，1 μl 测序酶/焦磷酸酯酶（13 U/μl）。

4）轻轻混匀，37℃保温 10 min。

5）每一管中加 20 μl 9.5 mol/L 醋酸铵和 90 μl 乙醇，轻轻混匀后置冰上 10 min。

6）室温中 13 000 *g* 离心 15 min 使其沉淀，300 μl 70%乙醇洗两次，真空短暂干燥，通常情况下肉眼看不到 DNA 沉淀。

3.2 DNA 测序胶的配制

1）仔细清洗玻璃板（由 Applied Biosystems, Inc. 供应）为荧光测序法的关键所在，因为尘埃和磨损可导致光的散射。玻璃板应仔细用稀释的 Alconox 液以软纸揩洗（可用大张 Kimwipe™），温水淋洗后再用蒸馏水彻底淋洗，然后用无水酒精淋洗，并在内表面以异丙醇揩洗，在空气中干燥。隔条及梳子也应作透彻的清洗和干燥。重要的是每一块板要指定一面为内表面，以尽量减少胶面由于玻璃磨损而起泡，要做到这一点可以在玻璃的外表面的一角用刻玻璃刀划一痕迹，或贴上胶带或用不褪色的墨水做记号。

2）将没有凹槽的玻璃板外表面朝下放在稳定的平台上。沿玻板两长边放置胶隔条，将带凹槽的玻板轻轻地放在无凹槽的玻板及隔条上，确保两块玻板边沿全部对齐，且隔条准确地安放在两块玻板间，在每一长边用两个大的夹子将玻板及隔条固定在一起。

3）在 250 ml 烧杯中加下列试剂以制备凝胶：22 g 尿素，8 ml 40% A 和 B，2.5 ml 20×TBE，加蒸馏水至 50 ml，55℃加热数分钟以溶解尿素，搅拌直至溶液变清晰，用 0.45 μm 滤膜过滤凝胶溶液（参见注释 5）。

4）把 245 μl 15% 过硫酸铵和 30 μl TEMED 加进凝胶溶液中，旋转烧杯以混匀液体并装满 60 ml 针筒。将凝胶板装置平放在台面上，于两块玻板间将凝胶沿带凹槽玻板顶部的边缘注入，从凝胶板装置的一侧开始缓慢地向另一侧移动注射器，靠毛细管

作用将胶吸入。如果出现气泡，用手指弹动玻板顶部使胶流过产生气泡的部位。当胶溶液的最前沿已到达胶的开口处时停止注液，在胶的顶部凹槽中插入直缘铸模梳子。沿凹槽玻板顶部用三个固定夹夹牢，凝胶至少应聚合 2 h。

5）取出夹子和梳子。凹槽玻板的内侧可能出现聚丙烯酰胺的薄片，用梳子沿槽边缘移动以去掉这些薄片，用水淋洗玻板外表面以去除任何遗留的胶物质，接着用乙醇淋洗，并在空气中干燥。用 Texwipe™玻璃清洁剂或异丙醇揩洗玻璃板的外表面，将凝胶装置放进 373A DNA 测序仪的电泳槽中。

6）重新启动 Macintosh 计算机，确保 ABI 数据收集软件和数据分析软件已预置在“自动运行”中。在 373A 测序仪上启动玻板检查功能以确保玻板已确实清洁干净，并且无脏物和凝胶物质。应在数据收集程序的“扫描”窗口扫描查看玻板，应当看到代表四种荧光颜色的四条平坦的线。如果看到蓝峰，意味着玻板上有尘埃或污点，应用异丙醇或 Texwipe™清洁剂仔细清除污点区，如有必要可重复玻板扫描检查。如果观察到四个峰，就表示是胶本身污染而造成的光散射，在这种情况下如果对胶作预电泳则峰可能会消失。如果清洗玻板和预电泳后污染峰仍持续存在，则建议重新制胶或在发生问题的区域的孔中不加样品。假如样品孔空置着，则电泳完成后要检查样品轨道，应确信污染峰没有被记录和分析。

7）将上边的缓冲液槽和塑料标尺放置就位。将鲨齿梳小心地插在两块玻璃板中间，利用标尺上的数字摆正梳子的位置。梳子的齿应恰恰穿入胶的顶部。拧紧上槽两个螺丝使标尺固定。用 1×TBE 缓冲液装满上下两个缓冲液槽。用滴管冲掉样品孔中的尿素，将 373A 和缓冲液槽的电极连接起来，关闭电泳槽的门。以 30 W 稳压在 40℃中预电泳 30 min，在预电泳过程中应当打开一个新的样品表（在“文件”菜单中），并输入适当的数据。

3.3 电泳和数据收集

1）在 5 μl 上样液中溶解干燥的测序反应物，98℃加热 3～5 min。

2）用滴管冲洗去除全部样品孔中的尿素，将标奇数的样品加进奇数孔中（如 1、3、5）。关闭电泳室门，以 30 W 恒功率在 40℃电泳 2～5 min 使样品进入凝胶中去。打开电泳室门，将偶数样品加入偶数孔中，关闭电泳室门，稳定于 30 W 在 40℃中电泳 10～14 h。由于样品进入胶时的盐效应，按奇数和偶数次序上样将使泳道间留下小的空隙，从而有利于分析软件准确地跟踪泳道。

3）用鼠标按下收集钮开始作数据收集。计算机将收集 10～14 h 的数据，这期间建议 Macintosh 主机不作其他用途。电泳期间可能出现的问题参见注释 6～14。

4）电泳完毕后打开电泳室门，虹吸取出上边缓冲液槽中的一部分缓冲液，拔掉电极线，切断激光电源，从仪器中小心取出上边缓冲液槽和凝胶装置。留在上边缓冲液槽的液体可以废弃，小心分开玻板，清洁后放置在安全的地方。避免用刀片取出凝胶，应用纸巾贴在胶上，使纸巾和凝胶一起脱离玻板后丢弃，冲洗上下两个缓冲液槽，倒置于纸巾上待干燥。

3.4 数据分析和评估

收集数据结束后，Macintosh 计算机将自动启动数据分析程序。这时，一份凝胶文件和包含每一样品的一份结果以及测序文件便会建立。有时最初阶段的分析可能会出现问题，导致分析数据的缺失。如果发生这类情况，可用注释 15 所述的恢复程序补救数据。从“窗口”菜单中选择“已分析数据”，可借助位于可移动的分析控制板上的放大器打开的任一样品文件进行查看。如果 Macintosh 主机连接有彩色打印机或绘图器，分析过的数据可被打印出来。此外，通过与另外的 Macintosh 计算机的网络连接，或利用如 NCSA Telnet 等信息交流程序将数据在 Sun 计算机上贮存起来。如果以后所取用的数据限于在 Macintosh 计算机上应用，样品文件应通过所选择的 MacBinary 程序转换。

通常，数据分析在未掺入的标记引物所产生的四种色块出现之后立即开始。然而由于外源荧光信号被检测，数据分析的起始有时会提前。这些样品可用手工操作进行分析；可通过查看该样品的原始数据以决定样品分析的新的起始点，从“分析”菜单中选择“碱基判读”，将新的起始点输入到适当的位置。可以打开位于“窗口”菜单下面的“分析列表”以监测分析过程。注意，可以同时进行多个样品的再分析。

可从几个方面发现数据质量的线索。最为明显的表现是数据的外观和范围。数据应有相当一致的信号强度，在整个读序范围中只应有轻度的下降。虽然在整个读序过程中都将进行碱基判读，但经验表明在 400 个碱基以后仪器的碱基确认准确性大为下降。对于相当高质量的样品，在最初 400 个碱基中“无碱基”（N）是不常见的。背景噪音，表现为沿着基线的许多小峰，应当不会高到干扰碱基的判读。过多噪音常由于模板不纯引起（参见注释 16～18）。有关数据质量的其他信息可从“文件信息”窗口获得。这里展示了信号和碱基间隔的数据。典型的情况下，对于一个高质量的样品来说，它的信号强度应比四种染料中最弱的一种大 40～50。碱基间隔应为 9～11；如果碱基间隔超出这一范围，精确的碱基判读可能受到影响。碱基间隔可通过调整胶和缓冲液成分以及电泳条件达到最佳状态。凝胶文件，包括全过程中计算机描绘的彩色“自显影图谱”也是评估数据质量的有用的资料。在这里应该可以看到直而分开的泳道，直到电泳最后阶段都有明显的条带。在观察凝胶文件中的数据时，与胶有关的问题往往显然可见。通过观察是否所有样品为白色的“跟踪线”所分开，就可以知道“跟踪线”的好坏。如果“跟踪线”没有很好地跟踪样品条带，该样品必须进行手工跟踪。从“分析”菜单中选择“跟踪泳道”并沿着样品泳道确定几点便可以达到这一目的。重新跟踪结束后样品即可进行自动分析。

4. 注　　释

(1) 通过 PCR 产生的模板

(i) PCR 反应可以用下列材料进行：噬菌体裂解物、DNA（0.01～1 μg）或接种到少量水或 TE 缓冲液中的细菌菌落或噬菌斑。反应液中应含下述成分：x μl 蒸馏水，5 μl 10 × PCR 缓冲液，8 μl 1.25 mmol/L dNTPs，2.5 μl 引物 1

(20 μmol/L)，2.5 μl 引物 2（20 μmol/L），y μl（一般用 1～5 μl）模板，0.2 μl *Taq* DNA 聚合酶（5 U/μl），总体积为 50 μl。

(ii) 如有必要，用 80 μl 轻质矿物油覆盖反应物表面。热循环仪预热到 95℃，样品放置预热的金属加热板块中，在 95℃ 保温 2 min。用 Perkin-Elmer 仪器按下述参数进行热循环反应：

DNA 热循环仪	9600 热循环仪
94℃ 30 s	92℃ 10 s
55℃ 30 s	55℃ 60 s
72℃ 60 s	72℃ 60 s
循环 35 次	循环 35 次

反应结束后，样品在 4℃ 保存。

(iii) 样品从反应管中取出，转移到装有 8 μl 3 mol/L 醋酸钠、pH 4.8，20 μl 40%（w/v）PEG-8000，10 mmol/L $MgCl_2$ 的 1.5 ml 微型离心管中，如果样品用矿物油覆盖，很重要的是不要把矿物油转移。样品通过涡旋振荡混匀后室温中放置 10 min。

(iv) 以 13 000 *g* 在室温中离心 15 min 以取得 DNA 沉淀。用抽气法小心地去除全部上清液。250 μl 100% 乙醇洗两次（室温），真空中稍事干燥。

(v) 用 20 μl 10 mmol/L Tris-HCl、pH 8.0，0.1 mmol/L EDTA 溶解各个样品。可取 1～2 ml 样品在琼脂糖凝胶上作分析。DNA 测序采用下面所描述的线性扩增分析方法：A、C 反应中用 1 μl PCR 制备的 DNA，G 和 T 反应中用 2 μl DNA。

这一方法可用来从黏粒或噬菌体克隆直接制备模板。

(2) 核苷酸类似物，例如 7-deaza-dATP 和 7-deaza-dGTP 可用于解析某些压缩的序列，可从 Boehringer-Mannheim Biochemicals（Indianapolis，IN）公司购得 10 mmol/L 的溶液。在所有的混合液中 7-deaza-dATP 和 7-deaza-dGTP 可取代 dATP 和 dGTP。dATP 混合液中，用 2.5 μl 7dc-dATP 和 10 μl 10 mmol/L 7dc-dGTP；dCTP 混合液中用 10 μl 10 mmol/L 7dc-dATP 和 10 mmol/L 7dc-dGTP；dGTP 混合液中用 5 μl 5 mmol/L7dc-dGTP 和 10 μl 10 mmol/L 7dc-dATP；dTTP 混合液中用 10 mmol/L 7dc-dATP 和 10 mmol/L 7dc-dGTP 各 20 μl。

(3) 以 M13 RP1 作为引物时，某些从 pUC18 和 pUC118 制备的 DNA 在 3′端引物位点已缺失了一个核苷酸。应用这些载体作亚克隆测序时，应当用缺少 3′C 的逆向引物，（T7）5′TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GG 3′，（SP6）5′ ATT-TAG-GTG-ACA-CTA-TAG 3′。

(4) 如果用荧光标记 SP6 测序引物，复性温度应从 55℃ 降到 50℃。同样地，对于其他的测序引物，应计算解链温度（T_m）并据此调整热循环条件。

(5) 如果每日都进行凝胶测序，工作胶溶液可配制好后在 4℃ 贮存。混合 110.3 g 尿素，40 ml 40% A&B，13 ml 20× TBE，125 ml 蒸馏水。按前述方法溶解尿素并进行过

滤。如果用不透明的瓶子保存，该溶液可用 2～3 星期，每一块胶用 50 ml。

(6) 如果扫描窗中没有发现扫描线，应检查 373A 机的“开始扫描”按钮是否确已按下。主菜单应读出“停止扫描”。如果扫描已经启动但无扫描线出现，停止这次操作并重新启动。如扫描线仍不出现，按主键盘上的删除键并在 LCD 菜单上选“全部重新设置”以重新启动 373A（注：重新设置将把日期、时间和 PMT 电压删去，在重新设置完毕后将这些数据再次输入）。如果重新设置不解决问题，则须检查 373A 与主机间的连接线。如果上述种种都不能解决任何问题，应与 ABI 地区服务部门联系。

(7) 扫描线条约为满度的 25%。在操作开始时观察扫描窗口，平坦的扫描线条应为满度的 25%～30%。如果扫描线条低于此值，则应增加 PMT 电压。在 PMT 电压的设置中先选用“标定”（calibration），再选用 LCD 菜单上的“安装”（configure），并进行随后的几种选择。每台机器的 PMT 电压设置都不同，并且可能随着激光的老化而改变。典型的情况下设置在 540～560 效果较好。

(8) 当电源发生故障时 373A 将对用户发出嘟嘟的报警声。这时应立即停止电泳或预电泳，然后再重新开始电泳。如果观察不到电流，则应打开电泳槽的门，检查电极线的连接，并检查螺丝的连接。如果电源故障依然存在，则在 373A 的主键盘上按删除键，并选择 LCD 上的“elect only”。如果以上种种都不解决问题，则应与 ABI 地区服务部门联系。

(9) 马达发生故障。驱动扫描仪的电马达有一定的寿命。这一部件的损坏常会先出现呼叫声。这一问题不容易由用户自行解决。应与 ABI 地区服务部门联系。

(10) 激光故障。各个氩激光的寿命虽然相差较大，但是都具有一定的寿命。为了保证不发生突然的激光故障，应每周进行激光检验。在 373A LCD“自测试”菜单上按“more”键直到激光测试选择显示出来。按“激光”键并输入“40”作为靶功率（即 40 mW）；准确记录激光输出和激光摄取的电流。当激光老化时则将耗去更多电流以产生所需的电压。如果激光故障明显，激光摄取的电流量将明显增加。此时，应与 ABI 地区服务部门联系。

(11) 凝胶聚合不完全。表现为凝胶文件中的畸形图形。测序胶要求聚合时间不少于2 h。如果已有足够的聚合时间，配制新的 15% APS 和 TEMED 可能解决这一问题。

(12) 样品带“互相渗透”。观察凝胶文件可发现这种现象，它可能是制胶时鲨齿梳子插入不当所致。梳子应插入到梳齿进入胶中 1～2 mm 为度。另外，如果插入梳子后稍有移动后再插入，胶孔间便可能出现渗漏。假如梳子造成部分凝胶损伤，则不应在损伤区加样或者重新制胶。聚合不完全的凝胶也可能造成样品渗漏（参见注释 11）。

(13) 样品泳道重叠。这可能是由于样品未能如上所述交替地加入孔内。如果加样重叠，泳道跟踪便可能受到干扰。如果第二次与第一次加样的间隔时间过长，还会发生另外的问题。这种情况下，伴随着反应产物前面的引物/盐前沿的荧光信号可能对泳道的恰当检测和跟踪产生干扰。加偶数样品前的时间间隔不应超过 5 min。

(14) 电泳速度太快或太慢。60～80 min 后凝胶上应能见到未掺入的染料引物或染料末端标记物。如果上述物质的高峰出现过早或过迟，数据分析可能受到严重影响。在

373A 上核实电泳条件；我们常规用 30 W 稳恒功率进行电泳。凝胶和缓冲液成分也应进行检查。除了 6%以外，其他浓度的聚丙烯酰胺胶都与 373A 不相匹配。

(15)计算机问题。Macintosh 主机硬盘容量超过 75%也可引起数据分析上的问题。为了避免这些问题，样品文件应进行拷贝，既可以拷贝在软盘上也可拷在输出的远端硬盘上，并进行适时删除。另外，Macintosh 主机应作为专用机，不应用作文字或图像处理，或作其他目的之用。在计算机上装载各种 INITs 和 cDevs（控制器）可导致严重问题。为了避免硬盘配制引起的问题，每月至少运行一次硬盘修复程序（如 Apple's Disk First Aid)。如果数据分析出现问题，检查数据收集程序或数据分析程序中位于“窗口”菜单下的“记录文件”（log file)。这一文件含有数据收集和分析事件表，可能为间歇发生的计算机问题提供线索。如果数据分析发生故障并且出现了错误的信息，运用恢复程序之一可以完全恢复全部数据。完整的错误信息列表和错误发生的原因可从 Applied Biosystems 公司获得，并可获得数据恢复的详细指南。推荐 373A 用户取得这一列表并将它张贴在测序仪的附近。

(16)测序数据过早终止。几个因素可能与测序的数据中断有关。如果制备模板用了 RNase 步骤，其中污染的 DNase 可能导致测序数据的中断。这问题常常伴随着背景峰的增加。模板 DNA 用量不足的反应会导致数据中断；也可以在文件信息窗口上见到明显减弱的信号强度。模板过多也会引起数据中断。如果为了去掉模板中的 RNA 而进行某种树酯的处理，污染物可能随 DNA 一起纯化而突出了这一问题。在这里为获得高质量测序所需的 DNA 的量应进行标定。另一常见的造成数据中断的原因是 dNTP / ddNTP 配方不正确。

(17)低信号强度。测序反应中模板 DNA 或引物用量不足可引起信号强度减低。应检查引物浓度是否准确。对于某些测序引物，标准的 55℃ 的复性温度可能太高，应当降低，对于线性扩增测序法更是如此。例如 SP6 引物用复性温度 50℃ 能获得很好的结果，如果用 55℃ 的复性温度则几乎不出现信号。测序试剂配方和贮存不正确也可导致低信号强度。

(18)高背景。含有大量 RNA 的 DNA 将形成高背景，对于线性扩增测序法尤其如此。另一引起高背景的常见原因是反应物中不止一种 DNA 模板的存在。这可能是不适当地挑取了不止一个菌落或噬菌斑之故，小心地挑取单个菌落或噬菌斑可避免发生这种情况。其他背景问题可能是因为在模板的制备或在测序反应中用了污染的试剂。

致　谢

作者对 R. Waterston 和 J. Sulston 以及线虫基因组测序项目的全体成员所给予的建议、支持和技术协助致以谢意。

参 考 文 献

1. Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connell, C. R., Heiner, C., Kent, S. B. H., and Hood, L. E. (1986) Fluorescence detection in automated DNA sequencing. *Nature* **321,** 674–679.
2. Ansorge, W., Sproat, B. S., Stegemann, J., Schwager, C., and Zenke, M. (1987) Automated DNA sequencing: ultrasensitive detection of fluorescent bands during electrophoresis. *Nucl. Acids Res.* **15,** 4593–4602.
3. Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., Cocuzza, A. J., Jensen, M. A., and Baumeister, K. (1987) A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* **238,** 336–341.
4. Brumbaugh, J. A., Middendorf, L. R., Grone, D. L., and Ruth, J. L. (1988) Continuous, on-line DNA sequencing using oligodeoxynucleotide primer with multiple fluorophores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85,** 5610–5614.
5. Kambara, H., Nishikawa, T., Katayama, Y., and Yamaguchi, T. (1988) Optimization of parameters in a DNA sequenator using fluorescence detection. *Biotechnology* **6,** 816–821.
6. Connell, C. R., Fung, S., Heiner, C., Bridgham, J., Chakerian, V., Heron, E., Jones, B., Menchen, S., Mordan, W., Raff, M., Recknor, M., Smith, L., Springer, J., Woo, S., and Hunkapiller, M. (1987) Automated DNA sequence analysis. *BioTechniques* **5,** 342–348.
7. Tabor, S. and Richardson, C. C. (1987) DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84,** 4767–4771.
8. Tabor, S. and Richardson, C. C. (1989) Effect of manganese ions on the incorporation of dideoxynucleotides by bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86,** 4076–4080.
9. Wilson, R. K., Chen, C., and Hood, L. (1990) Optimization of asymmetric polymerase chain reaction for fluorescent DNA sequencing. *BioTechniques* **8,** 184–189.
10. Wilson, R. K., Chen, C., Avdalovic, N., Burns, J., and Hood, L. (1990) Development of an automated procedure for fluorescent DNA sequencing. *Genomics* **6,** 626–634.
11. Koop, B. F., Wilson, R. K., Chen, C., Halloran, N., Sciammis, R., and Hood, L. (1990) Sequencing reactions in microtiter plates. *BioTechniques* **9,** 32–37.
12. Seto, D. (1991) A temperature regulator for microtiter plates. *Nucleic Acids Res.* **19,** 2506.

第五十二章　用于 Maxam-Gilbert DNA 测序法中的 DNA 末端标记

Eran Pichersky

1. 引　　言

两种酶可用来在 DNA 的末端标记上同位素^{32}P。T4 多核苷酸激酶可将 ATP 的一个磷酸基团（ATP 的 γ-磷酸基团）优先加到 5′端。DNA 聚合酶可将互补的核苷酸补平缩进的 3′端缺口，它的 3′→5′外切酶活性也能使平末端或 3′端凸出成为 3′端凹进，然后同样地补平这些空缺。不过聚合酶常用于填充反应，而 *E. coli* DNA Pol I Klenow 片段只有很低的 3′→5′外切酶活性，因而对于用于测序的 DNA 的末端标记来讲，它对平末端和 3′端的填充活力在原则上可以忽略不计（参见注释 1）。

用限制酶消化得到的线状双链 DNA 分子一般是 DNA 末端标记的起始材料。(由于几乎所有的限制酶都作用于双链 DNA)，经它作用后的 DNA 可以说具有两个 5′端和两个 3′端。因此 T4 DNA 多核苷酸激酶将标记两个 5′端（在双链分子的两个相反的末端上)，而 Klenow 酶使它们形成两个标记的 3′端，也同样标记双链分子的两个相反的末端。不过注意，每一链仅被标记一端。

要获得适用于化学测序的标记 DNA，可以采用下列两种方法之一。一种是使 DNA 变性并将两链分离（每一链只在一端被标记)。虽然在原则上有时是可行的（例如，用较长变性胶电泳较长的时间)，但另一方法则更为简便，因此分离末端标记的单链的方法几乎从未实际应用过。在另一方法中消化两端标记的双链 DNA 分子，然后在另一种切在两个末端之间的限制酶的作用下产生两个片段（幸运的话，长度不等)，每一片段只在双链分子所产生的四个末端之一被标记上。接着在非变性丙烯酰胺凝胶上可将两个片段分开，重新分离后直接用于测序。虽然这样的片段是双链分子，只有一条链做了标记，而且这链仅在一端被标记。所有化学反应进行如常。然后对样品进行变性及电泳(参见第五十三章)；未经标记链的降解产物不会在自显影谱上显示出来，也就对测序过程没有影响[1]。

须要考虑的一个重要因素是标记反应所用的起始物质，它可以是被克隆进质粒的 DNA，或者是一个重组噬菌体或 PCR 产物。我们认为用 CsCl 作梯度离心纯化的 DNA 是最好的来源，虽然由各种微量制备方法得来的质粒也是适用的。DNA 必须经限制性内切酶切割，产生至少一个或几个线性片段。如果用作模板的 DNA 经限制酶消化后产生了不止一个片段，而只要求对某一特定片段作测序，那么在进行末端标记前先分离出该片段，例如通过琼脂糖凝胶电泳洗脱进行分离应该是可取的。不过每一纯化步骤会引起一些 DNA 的丢失（可是在标记好以后一般总得再一次分离目标片段以去除未掺入的标记物，而且当不止一种片段被标记时，将它和其他片段相分离)。此外，从琼脂糖凝

胶上洗脱下来的片段不像仍在限制酶切反应试管中的那些片段那样标记得好。因此，要取得高产量和高比活，最好是在一个反应管中完成全部的反应，不要经受纯化的种种步骤和改变缓冲体系。然后这些片段在丙烯酰胺凝胶上进行分离，按理可得到 100～1000 个核苷酸范围内的片段（参见注释 2）。

怎样才能在同一个反应管中不改变缓冲体系而取得只标记一个末端的 DNA 片段呢？我们利用*E. coli* 聚合酶 I 的 Klenow 片段的特点，标记 3′缩进的末端（补平反应）而不标记 5′缩进的末端（即 3′突出）或平末端（理论上 Klenow 也能对 5′缩进端和平末端进行标记，不过在程度上大大地低于 3′缩进端，因此实际上可以看作 Klenow 片段只对一端标记，参见注释 1 和 3）。所以在一个须测序的片段中如果已经存在一个能形成 3′缩进的酶切位点时，我们只须在它的近旁找一个经酶切后两端都不被标记的酶切位点即可。例如限制酶 *Pst* Ⅰ、*Sac* Ⅰ、*Sph* Ⅰ（3′凸出）和 *Dra* Ⅰ、*Hae* Ⅲ以及 *Rsa* Ⅰ（平末端），在我们所采用的条件下，在下列反应中所产生的酶切位点基本上都是不标记的。应该注意，由于标记的片段须在丙烯酰胺凝胶上分离，因此所产生的片段的大小有一个上限（在凝胶上＞1 kb 的片段分离得不好，并且也不容易扩散到溶液里）。如果在做上标记的位点近旁没有已知的有用位点时，我们就用切割四个碱基的酶，例如 *Hae* Ⅲ，因为可以假定在标记位点的不远处肯定会有这样的位点存在。如果情况并不是这样，那么可以换其他切割 4 bp 的酶，直到找到一种合适的酶为止。此外，当小片段克隆到质粒的多位点接头时，我们可以利用多位点接头上的限制酶切位点。这样就可以选出两种酶，它们分别使克隆片段的一端产生 3′缩进而另一端产生 3′凸出。于是就可使这一片段只在一端标记，在另一反应中采用另一对酶，这一片段的另一端也可被标记。

2. 材　　料

1）DNA：经 CsCl 纯化的质粒，1 μg/μl。
2）限制酶。
3）限制酶缓冲液（由制造商供应）。
4）DNA Pol I Klenow 片段。
5）[α-^{32}P]dATP；比活＝3000 Ci/mmol。
6）10 mmol/L dCTP。
7）10 mmol/L dTTP。
8）10 mmol/L dGTP。
9）上样染料：50 mmol/L EDTA，10 mmol/L HCl、pH 7.5，0.1%（w/v）溴酚蓝，0.1%（w/v）二甲苯青 FF，50%甘油。
10）10×TBE 缓冲液：0.5 mol/L Tris-HCl，0.5 mol/L 硼酸，10 mmol/L EDTA、pH 7.5[2]。
11）丙烯酰胺。
12）双丙烯酰胺。
13）100%乙醇。
14）0.5 mol/L 醋酸铵，1 mmol/L EDTA、pH 7.5。

15)玻璃移液管。

16)玻璃羊毛。

17)ddH_2O（双蒸水）。

3. 方　　法

1）在总体积 30 μl 中用酶消化 1 μg DNA，每一种酶 1～3 U（如 2 U *Eco*RI，2U *Hae* Ⅲ），37℃中保温 30 min。

2）混匀下述液体：1 μl dTTP，1 μl dCTP，1 μl dGTP，1 μl ^{32}P（α)-dATP，1 U Klenow 酶，加入反应管中，37℃中保温 20～30 min。

3）加 20 μl 上样染料液以终止反应（注意：与琼脂糖凝胶中用的是同一种染料，但与测序胶中用的染料不一样）。

4）将样品加在 15 cm 长、0.3 mm 厚的非变性 5％丙烯酰胺凝胶上（丙烯酰胺与双丙烯酰胺之比为 20∶1，1×TBE 缓冲液），样品槽宽 3～4 cm。待溴酚蓝跑到凝胶底部时停止电泳。取去一块玻璃，然后用 Saran Wrap™纸盖住凝胶。在暗室里将 X 射线底片放在盖住了的胶上，标明底片在胶上位置，曝光 5～10 min。然后将底片显影。

5）将显影后的 X 射线底片摆在凝胶上，找出标记 DNA 片段的位置，切下并取出相应位置的凝胶，放入 1.5 ml Eppendorf 管中，不必将凝胶切成小片。加入 0.6 ml 0.5 mol/L醋酸铵、1 mmol/L EDTA、pH 7.5 溶液，充分摇动，确保整个凝胶条浸没，然后在 37℃中至少保温 8 h（或过夜）。

6）用底部塞有玻璃羊毛的吸管吸取管中溶液，使溶液通过玻璃羊毛移入另一管中。加 1 ml 100％乙醇，充分摇动后立即离心 10 min。倒去上清液，加入乙醇，离心2 min，再次丢弃上清液，用拉尖的滴管抽气吸出剩余液体。真空中干燥 10 min。加 ddH_2O（50～100 μl，用量由放射活性的量来决定）重悬样品。至此，DNA 已可作测序用(参见第五十三章)。

4. 注　　释

（1）用 Klenow 酶进行标记的反应可直接在限制酶消化反应管里进行，无须改变缓冲液。根据酶的要求，限制酶消化可在低、中或高盐的缓冲液中进行，这三种缓冲液中都含有 Mg^{2+}。Klenow 酶在上述缓冲体系中作用都很好，因此在整个标记反应中，只须加入放射性和非放射性的核苷酸及 Klenow 酶。也可一次加入全部反应物，即将限制酶、核苷酸和 Klenow 酶一起加入。不过作者喜欢使标记反应仅作用 20～30 min，而 1 μg 的 DNA 的限制酶切则大约需 1 h。因此，标记混合液应在限制酶反应开始后 30 min 加入。

只要有可能，作者喜欢用^{32}P-dATP 做标记，因为在作者实验室中^{32}P-dATP 作为标准的放射性核苷酸，也用于其他多种目的。几乎所有的 3′缩进末端都可用 dATP 标记。位点上其余的核苷酸必须以非放射性状态加入，如果它们出现在 A 核苷酸的上游，则直到其他的核苷酸加入后再加入 A。如果它们出现在 A 的下游，

还是应把它们包括在反应中，因为它们以明显高于^{32}P-dATP浓度出现，因此，一旦加入了A核苷酸，其下游位点几乎以100%的效率被补充，而Klenow酶不能回头用它的3′→5′外切酶活性切掉A核苷酸。作为常规，作者把三种非放射性的核苷酸（dTTP，dCTP，dGTP）都加入，即使其中某一核苷酸不出现在该位点。不需要的核苷酸对标记反应没有作用。非放射性核苷酸的另一有用之处是在另一端（常常是3′突出端或平末端）也可以立即为非放射性的核苷酸所填充，即使在Klenow3′→5′外切酶的作用下产生了3′缩进末端也是这样。当然，除非该位点确实需要一个A核苷酸。似乎在后一种情况下，测序自显影谱上可能会出现较高的背景，但作者并不觉得这是一个问题，这可能是因为Klenow酶的3′→5′外切酶的作用较慢和填充反应时间较短（20 min）。

(2) 作者用5%的非变性丙烯酰胺凝胶纯化标记片段。所分离片段大小为100～1000 bp。对小于这一范围的片段不值得作测序，虽然在丙烯酰胺凝胶上可以分离这样的片段，而>1000 bp的片段在凝胶中不易分开。即使用琼脂糖凝胶可分离大片段，可是作者从来就不能用直接从琼脂糖凝胶分离的片段来测序（标记前的DNA可以在琼脂糖凝胶上电泳，但在测序前应先从丙烯酰胺凝胶上再行分离一次。用从琼脂糖凝胶上直接分离的片段测序时，序列的可读性极差）。

至于洗脱片段，作者仅将胶在37℃的洗脱缓冲液中保温过夜，但并不捣碎。DNA能很好地扩散出来，虽然较大片段扩散较慢。经过夜保温后，含1 kb左右的片段的管中的放射性至少有50%进入溶液，对于较小的片段来说，则这百分值更大。然后用玻璃羊毛过滤溶液去除较大块的丙烯酰胺凝胶。残留的丙烯酰胺（单体或小的多聚体）对测序反应或以后对DNA的操作并无干扰，即使它与DNA一起沉淀下来。

要沉淀标记的DNA，作者在室温下加二倍体积的100%乙醇，混合后立即离心。不必用任何其他浓度的乙醇。目的是要使尽可能少的盐和DNA一同被沉淀下来。乙醇沉淀后抽气去除液体，再加乙醇洗涤一次，抽气去除液体。沉淀出现在管壁上。用拉尖的滴管伸进离心管的底部吸尽所有液体。重复操作悬浮及沉淀步骤并无必要。在低温下长时间保温也大可不必。室温中DNA沉淀较好，而低温下会使盐沉淀得更多，事情不是更好反而更糟。

(3) 应用T4-多核苷酸激酶的DNA标记反应需要较长时间，并且须使用大量的放射性物质及多次变换缓冲液。因为这些缺点，作者从不用这种酶做末端标记来测序。

参 考 文 献

1. Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Method. Enzymol.* **65,** 499–560.
2. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

第五十三章　DNA 的化学测序

Eran Pichersky

1. 引　　言

DNA 化学测序方法[1]与酶法测序[2]相比，既有优点也有缺点。主要的缺点是作同样量的测序须要花更多的时间，之所以如此，有两个方面的原因。第一，在实际作化学测序反应前必须对 DNA 进行末端标记，并且须再次分离，这一步骤常常须用额外的一天时间（参见第五十二章）。并且由于在反应中须用更多的 DNA，以及由于所测序的 DNA 的放射性比活较低，因此在自显影中须用增感屏，所得到的电泳条带不及酶方法清晰，因此难以取得大约 250 个核苷酸以上序列的可靠测序结果（除非跑很长的凝胶）。

不过化学方法常常在几个方面值得采用。可以从一个克隆的任何位置开始进行测序而无须先行亚克隆，只要在这一位置上有一个可以用以进行标记的限制酶切位点。所得到的序列可用来合成寡核苷酸引物用于酶法测序。此外，在酶法测序中某些区域的测序结果不理想的情况下（因为二级结构阻碍了聚合酶反应），化学方法几乎总是能解决这一问题并获得正确的测序结果。

化学测序有技术难度大的“美称”。作者认为这种美称是过奖了。作者的实验室用化学方法获得的结果如同酶法一样成功可靠。根据作者的经验，可以认为分子生物学的许多操作方法中包含着不少不必要的步骤。可能的解释是当研究者遇到困难时便增加了这些步骤以求解决问题，往往假定增加的步骤即使并无帮助至少不会对整个过程造成问题。这种想法显然是有问题的。在这里所介绍的对现有方法的改进中，许多步骤已被略去。一般情况下，作者认为逐步省略这些步骤使序列的质量得到了改进。可能仍然还有一些步骤是不必要的，但肯定没有必要再增加一些额外的步骤。而且，这些改动的最终结果是使这里所介绍的方法十分简便，整个测序过程（从 DNA 的末端标记开始）包括凝胶电泳在内所用时间不超过 1 天（整整一天）。

2. 材　　料

1）G 缓冲液：50 mmol/L 二甲胂酸钠（sodium cacodylate）、pH 8.0。

2）CT/C 终止液：0.3 mol/L 醋酸钠，1 mmol/L EDTA、pH 7.0。

3）AG 终止液：0.3 mol/L 醋酸钠、pH 7.0。

4）G 终止液：1.5 mol/L 醋酸钠，1 mol/L 2-巯基乙醇、pH 7.0。

5）10% 甲酸。

6）硫酸二甲酯（DMS）（参见注释 1）。

7）肼（95% 无水）（参见注释 1）。

8) 100%乙醇。
9) 5 mol/L NaCl。
10) ddH_2O（双重蒸馏水）
11) 载体 DNA：1 mg/ml，溶于 ddH_2O 中（可用任何 DNA，作者用质粒 DNA）。
12) tRNA：10 mg / ml，溶于 ddH_2O 中（可用任何 tRNA）。
13) 待测序的 DNA 片段，只在一端作上标记，溶在 ddH_2O 中（参见第五十二章）。
14) 10%六氢吡啶（实验当天稀释）。
15) 上样缓冲液：100%甲酰胺，0.1%（w/v）溴酚蓝，0.1%（w/v）二甲苯青 FF。

3. 方　　法

1) 对每一待测序 DNA 片段用四个做上记号的 1.5 ml Eppendorf 反应管，加下述溶液：
   "G"管：1 μl 载体 DNA，200 μl G 缓冲液，5 μl 标记 DNA。
   "AG"管：1 μl 载体 DNA，10 μl 双蒸水，10 μl 标记 DNA。
   "CT"管：1 μl 载体 DNA，10 μl 双蒸水，10 μl 标记 DNA。
   "C"管：1 μl 载体 DNA，15 μl 5 mol/L NaCl，5 μl 标记 DNA。
2) 把四个 1.5 ml Eppendorf 管标以终止字样并加下述溶液：
   "G 终止"管：2 μl tRNA，50 μl G 终止液，1 ml 乙醇。
   "AG 终止"管：2 μl tRNA，200 μl AG 终止液，1 ml 乙醇。
   "CT 终止"管：2 μl tRNA，200 μl CT/C 终止液，1 ml 乙醇。
   "C 终止"管：2 μl tRNA，200 μl CT/C 终止液，1 ml 乙醇。
3) 分别向下列各管加溶液以启动反应（参见注释 2）：
   "G"管：1 μl DMS，混匀，室温反应 5 min。
   "AG"管：3 μl 10%甲酸，混匀，37℃反应 15 min。
   "CT"管：30 μl 肼，混匀，室温反应 9 min。
   "C"管：30 μl 肼，混匀，室温反应 11 min。
4) 吸取对应的终止管中的全部液体加入反应管中以终止反应（可用同一支滴管，终止液略微交叉污染不影响结果，但不要将滴管接触反应管的内容物），盖紧反应管，短暂振荡但须剧烈，放在干冰-乙醇浴中（－80℃）3～10 min（3 min 已足够，如果其他管的操作仍然未完成，可将管放在冰浴中达 10 min；但不要超过 10 min）（参见注释 3）。
5) 4℃中离心 7 min，丢弃上清液，用一尖嘴的滴管抽气吸出剩余的液体，然后加 1 ml 100%乙醇，倒转两次，室温中离心 2 min。再次抽气吸出剩余的液体，真空中干燥 10 min。
6) 在各反应管中加进 100 μl 10%六氢吡啶溶液（不要振动管子，因并无必要重悬 DNA），试管敞开放在 90℃加热金属板上。15～30 s 后加盖放置 30 min。
7) 从金属板上取出试管，室温放置 2～5 min，短暂离心使管壁上的冷凝水滴沉到试管底部，用注射针头在试管盖上穿一个洞，然后放在干冰-乙醇浴中 5 min。
8) 将试管放入 Speed Vac 机器，冻干 2 h，真空应保持在 100 毫托（millitorr）（1 torr＝

1.33×10^2 Pa）以下。

9）电泳前每管加 10 μl 上样缓冲液，振荡使沉淀重悬并短暂离心，将试管置 90℃ 加热金属板上 10 min，每一样品取 1～2 μl 上样（参见注释 4 和 5）。

4．注　　释

（1）化学药品的质量：一般来说，应使用标准实验室级别的试剂。某些化学药品由于纯度不足或放置时间过长（大概是由于降解之故）可能是出现问题的原因。作者只在两种化学药品上遇到过问题（见下述）：硫酸二甲酯和肼。也须注意，上述两种化学物质和六氢吡啶都属于有毒化合物。除了应遵循处理与放射性化合物有关的规定外，与这三种化合物有关的所有反应均须在通风橱中进行。

（2）通常作者将全部化学反应放在一起进行，并使反应在同一时间结束。如果要测序 5 种不同的样品，全部 20 个管可作一次离心（作者的实验室有一个放置 20 个离心管的微型离心机）。将 20 个管的反应几乎在同一时间停止，某些反应往往须要设定较长的时间，但一般这并不成为问题，因为上述所设定的时间是一般性的，可被延长 30％而没有太明显的影响。

（3）作者总是用 100％乙醇。在整个过程中并没有必要使用其他浓度的乙醇，100％乙醇有蒸发快的优点。目的是要沉淀 DNA 片段而尽可能减少盐的伴同沉淀。可以通过在乙醇沉淀后以及用乙醇洗涤后抽气吸出全部液体而达到此目的。沉淀物能很好地在管壁形成，很容易将较长的滴管伸到试管的底部以吸出全部液体。重复再悬浮及沉淀是不可取的步骤。也完全不鼓励延长干冰-乙醇浴中放置的时间。室温下 DNA 沉淀良好，但在低温下会得到更多的盐沉淀物，因此使事情更坏而不是更好。作者几乎都在室温下沉淀 DNA；只在步骤 4 使用 −80℃ 保温，目的在于使反应不由于未经去除的反应试剂的存在而继续进行。

（4）凝胶电泳：作者用 60 cm×40 cm（0.3 mm 厚）的 6％丙烯酰胺胶（丙烯酰胺∶双丙烯酰胺为 2∶1，50％尿素，50 mmol/L Tris，50 mmol/L 硼酸盐，1 mmol/L EDTA[3]）。用 65 W 恒功率电泳，用铝板散热。样品分两次上样（长时间的和短时间的电泳）：第一次样品中的二甲苯青染料跑到胶全长的 2/3 的路程时进行第二次上样。第二次样品中的溴酚蓝跑到胶的底部时停止电泳。全部电泳需时 5～6 h，在短时间电泳中大约可读出从 25 到 150～250 个核苷酸，在长时间电泳中读出的核苷酸数可从 100 到 200～250。更长的序列可用较长的凝胶通过第三次加样取得，如果有必要也可采用其他多种方法。

（5）故障分析：

G 反应：这一反应常常是清楚的，但它对延长保温时间及高活性试剂 DMS 的质量最为敏感。如果反应超过所设定的时间或使用过期或质量低劣的 DMS，将会出现过多或非特异性的 DNA 降解产物。而且当几个 G 连续出现时（在 3′端用 Klenow 酶标记的情况下，其中下方的几个 G）可能条带较弱。

AG 反应：这是经常不出现问题的反应。

CT 和 C 反应：肼的质量应好（但没有必要特别好），否则会发生过多的和非特异

的降解。当碱基为 G 时，有时在 C 和 CT 轨道上会出现弱的条带（这时在 G 轨道上出现一条强带）。可能的解释是试管中 pH 值太低（C，CT 管中无缓冲液，但是从 DNA 样品中带入的缓冲液可能会引起这一问题）。不过这类弱带不及 G 轨道的信号强，也不及 C 和 CT 碱基的真实条带强。此外，CT 轨道上的 T 常不如 C 带强，这可能是由于残留的盐抑制了反应的缘故（在 C 反应中，为了使反应完全被抑制，特别加入了盐）。

参 考 文 献

1. Maxam, A. M. and Gilbert, W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Meth. Enzymol.* **65,** 499–560.
2. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74,** 5463–5467.
3. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.

第七部分
定点诱变与蛋白质合成

第五十四章　双链质粒的定点诱变、结构域置换以及标记获救

Jac A. Nickoloff, Win-Ping Deng,
Elizabeth M. Miller, F. Andrew Ray

1. 引　　言

寡核苷酸介导的诱变可用于向克隆 DNA 中引入特定变异，包括碱基对置换、插入和缺失。这是研究基因表达和蛋白质结构与功能关系的一个重要途径。已有多种方法可使质粒 DNA 的特定碱基发生突变，所有这些方法都涉及带有特定突变的寡核苷酸引物与目的序列的复性[1~4]；（见综述 5）。在引物引导下的 DNA 合成产生一条带有预期突变的 DNA 链，该链转化进入*E. coli* 宿主后，在 DNA 复制过程中可能与野生型模板链发生分离。虽然突变产物的理论得率是 50%，但实际得率通常要低得多，因此必须设法富集来自突变链的产物。有两种成功的富集突变型的策略，一是使胸腺嘧啶被尿嘧啶取代了的野生型链在体内降解[3,6]；（参阅第五十五章）；二是在新合成的链上同时引入另一个具有某种功能的能（被）选择的标记，如 β-内酰胺酶基因，通过功能筛选而富集突变型[7]。第二种方法依赖于在 DNA 合成过程中两种引物的配合，而且还可由于用 T4 DNA 聚合酶代替*E. coli* DNA 聚合酶的 Klenow 片段而得以改进，因为 T4 DNA 聚合酶不会置换诱变引物[8,9]。使用错配修复缺陷宿主（*mut* S）还可以提高双引物诱变的效率[10]，因为这能增加能（被）选择的突变与非能（被）选择的（nonselectable）（所期望的）突变在第一轮 DNA 复制期间得以偶联分离的概率。

虽然通过这些早期方法可高效率地得到突变，但它们都受到靶序列及引物设计的诸多限制，并且都需要制备单链模板的工作。这里介绍两种相关的方法，都涉及限制酶切位点的并发诱变。这些方法不仅高效、快速，而且在靶序列的选择和引物设计以及引入多重突变的策略上具有更大的灵活性[11,12]；（图 54.1）。两种方法对于几乎任何质粒，不论双链或单链，都可有效应用。双链质粒经热变性产生单链模板，然后使诱变引物与模板复性，用以消除非必需的限制酶位点［能（被）选择的突变］并且用以引入所期望的非能（被）选择的突变。在转化进入*E. coli* 之前用能识别该非必需的限制酶切位点的限制酶处理突变型的和非突变型的质粒 DNA 混合物，就可将非突变型质粒通过筛选而排除。通过这样的处理，野生型质粒被酶切开，突变质粒因不能被酶切割而保持环状，从而使前者的转化效率减少到低于后者约 10～1000 倍。在引物引导的 DNA 合成过程中，正常情况下，所期望的突变与能（被）选择的突变发生连锁的频率大于 80%，所以我们可以得到所期望的突变。两种方法的区别在于诱变引物在体外连锁到一起的方式不同。在原始的方法——惟一位点消除（unique site elimination, USE）诱变中，与一条链互补的两个诱变引物在第二条链的合成过程中连锁到一起[11]。在第二种方法

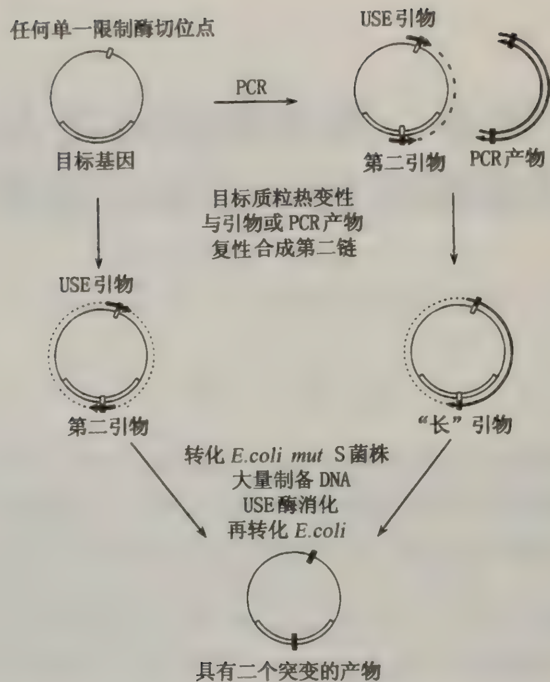


图 54.1 用限制酶切位点并发诱变的方法进行定点诱变。图的上部是两个具有非必需的惟一限制酶切位点（空心长方小块）的靶质粒。USE 和 LP-USE 诱变分别图示于左边和右边。黑箭头表示诱变引物；黑色长方小块表示突变。靶质粒 DNA 经加热变性，引物引导的 DNA 合成（虚线）连接两个诱变引物或延伸带有两个引物的 PCR 产物。USE 引物引入的突变是可选择的。将 DNA 转化到 *E. coli mut* S 菌株中以提高两个突变连锁分离的频率。从全部 *mut* S 转化子培养物制备质粒 DNA，用识别靶惟一位点的限制酶处理，再转化到正常 *E. coli* 菌株中，通常就能得到带有两个突变的产物。同时使用针对不同惟一位点的几种 USE 引物可以进一步提高选择的力度。

中[12]，分别与 DNA 两条链互补的两个诱变引物通过 PCR 过程连锁到一起；随后，变性的 PCR 产物（作为一个“长引物”）指导第二条链的合成（长引物惟一位点消除诱变，LP-USE mutagenesis)[12]。

对限制酶切位点消除的选择既简单易行又广泛适用。大多数质粒都具有适于引入能（被）选择的突变的一个或多个限制酶位点（USE 位点）；也可以通过人工改造而引入合适的 USE 位点。环状单链模板可简单地通过双链质粒 DNA 热变性得到，所以事实上任何双链质粒都能用这些方法有效地进行诱变。从 M13 噬菌体或噬粒得到的环状单链 DNA 也可作为合适的模板。因为无须通过亚克隆就能对靶基因诱变，这些方法也是对表达载体上的基因进行诱变的很好途径。从双链质粒开始进行诱变的另一个好处是诱变引物可以与两条链中的任一条互补。这样，就有可能设计通用于诱变、测序、杂交和 PCR 的多功能引物。而且，引物对既可以与同一条链互补[11]，或者先进行 PCR 扩增后也可以分别与两条链互补[12]。

可设计多种通用引物用以消除多种载体上共同序列中的限制酶切位点。所以，只需很少几种引物就能向大多数质粒上引入突变。USE 位点可以位于基因外或基因内，包括各种必要的基因如抗生素抗性基因。如果靶位点存在于一个必要的基因中，可通过改

变密码子第三位上的碱基或不影响读框的碱基插入来引入无表型效应的突变。某些诱变引物可以将一种限制酶切位点转变成另一种限制酶切位点。如果新产生的限制位点也是惟一的，就可以通过在两种惟一的限制位点之间的循环变换而连续地向靶基因中引入多重突变。

表 54.1　通用的惟一位点消除引物

靶位点	新位点	序　列	载　体
1a. *Aat* II	*Sal* I	GTGCCACCT**GTCGAC**TAAGAAACC	1,2,4
1b. *Sal* I	*Aat* II	GTGCCACCT**GACGTC**TAAGAAACC	1,2,4
2a. *Afl* III	*Bgl* II	CAGGAAAGA**AGATCT**GAGCAAAAG	1~6
2b. *Bgl* II	*Afl* III	CAGGAAAGA**ACATGT**GAGCAAAAG	1~6
3a. *Sca* I	*Mlu* I	CTGTGACTGGTG**ACGCGT**CAACCAAGTC	1~6
3b. *Mlu* I	*Sca* I	CTGTGACTGGTG**AGTACT**CAACCAAGTC	1~6
4a. *Ssp* I	*Eco*RV	CTTCCTTTTTC**GATATC**ATTGAAGCATTT	1,2,4
4b. *Eco*RV	*Ssp* I	CTTCCTTTTTC**AATATT**ATTGAAGCATTT	1,2,4
5. *Alw*NI	*Pvu* II	CTGGCAGC**AGΔCTG**GTAACAG	1~6
6. *Xmn* I	None	TTG**GAAAACGCTC**TTCGGGGCG	1,3~6
7. *Bsa* I	None	TGATACCGC**GGGACC**CACGCTC	1~6
8. *Sca* I	None	CTGGTG**AGTATT**CAACCAAGTC	1~6
9. *Eco*RI	*Eco*RV	CGGCCAGT**GATATC**GAGCTCGG	1
10. *Hin*dIII	*Mlu* I	CAGGCATGC**ACGCGT**GGCGTAATC	1

表中所列是一些针对基因间隔区和多位点接头区的靶位点和新形成位点。靶密码子属于β-内酰胺酶基因，所列序列与β-内酰胺酶基因的有义链互补。新形成的限制酶切位点（如果不形成新位点，则为突变了的靶限制酶切位点）用黑体字母标出；突变碱基下加黑点。载体：1，pUC19；2，pBR322；3，pBluescript 和 pBluescript Ⅱ；4，pSP6/T3 和 pSP6/T7-19；5，pT7/T3α-19；6，pTZ19R。引物对（即 1a 和 1b）中两种引物的轮换使用可形成突变与野生型的往复循环。如果原有的野生型 *Sal*I 位点已被破坏，那么引物 1b 就可应用于所列的载体。只有当 pSP6/T3上原有的野生型 *Bgl* Ⅱ 位点已被破坏时，引物 2b 才可应用于该载体。当原有的野生型 *Eco*RⅤ位点已被破坏时，引物 4b 可应用于 pBR322。*Alw*NI 引物造成核苷酸缺失 CCA（Δ）。*Eco*RI 和 *Hin*dⅢ 引物造成多位点接头区的缺失，如果诱变引物位置上插入了外源 DNA 时，就不能使用这两种引物。

表 54.1 列出了一些这样的 USE 引物。另外，也可通过向 USE 诱变的 DNA 合成反应中同时加入多种诱变引物而一次性地引入多重突变。利用这种方法得到多重突变的频率大约是各单独诱变频率的乘积。虽然，使用基于 PCR 的诱变方法也可以一次引入多重突变（通过采用基于 PCR 的诱变方法，见参考文献[13]），但用上述标准方法要简便得多。

这些方法最初被称为惟一位点消除（USE）诱变，因为它的最简单“版本”依赖于选择单个惟一的酶切位点的消失。不过如果有多个限制酶切位点被消除，就会有更高的灵活性和更大的选择力度。两个（或多个）相同或不相同的限制酶切位点的消除也能被选择。使多个限制酶切位点被诱变时就增加了针对非突变型的选择压力，这对于大质粒（>10 kb）的诱变可能是很重要的。

限制酶切位点并发诱变方法可以用来将突变从任何基因组中的某个基因转移到它的克隆拷贝上，或从某一质粒转移到另一质粒上。使用这些方法，无须进行片段的亚克隆就能实现突变的转移，所以也不必要求在突变原在位置的 DNA 顺序中存在着天然的或人工的限制酶切位点。这里介绍的三种非常有效的 LP-USE 诱变法适用于所有生物，可用于分析特定基因或基因内特定结构域的功能。例如，从某一基因的克隆拷贝开始，可用 USE 或 LP-USE 诱变法引入各种特定的突变（图 54.1）。这些突变可以（通过转染）转移到某种宿主细胞中以分析突变的表型效应。接下来，突变的存在可通过 LP-USE 诱

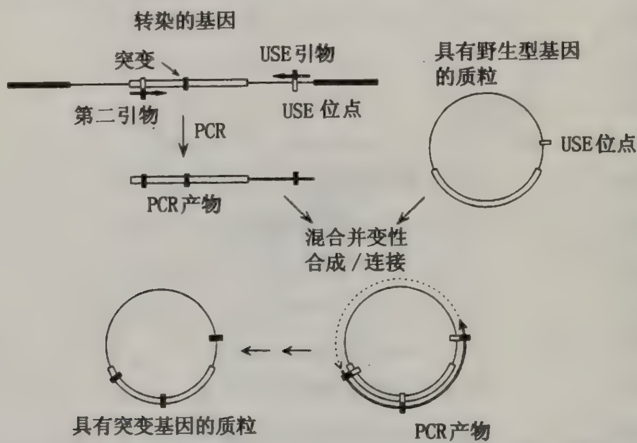


图 54.2 转染基因中突变的证实。图示一个带有突变基因（细线）的质粒整合在基因组 DNA（粗线）上。使用突变两侧的一个 USE 引物和一个第二引物进行 PCR，得到一个带有三个突变（粗短黑线）的片段。接着该 PCR 产物引导带有野生型基因的质粒模板进行第二条链的合成。余下的步骤如图 54.1 所示。第二引物上也可带有一个能产生新限制酶切位点的突变。丢失了 USE 位点并获得了新限制酶切位点的产物将带有原来在转染基因上的突变，它的存在可以通过 DNA 序列分析加以鉴定。

变法的第一种应用加以证实（图 54.2）。LP-USE 诱变法的第二种应用所引起的结构域置换可用于对来自同一基因家族的相关基因或来自不同种属的相关基因的同源区域进行功能分析（见参考文献[14]）。结构域置换也能方便地将突变从一个质粒转移到另一质粒。例如某一基因中的突变可以从一个带组成型启动子的表达载体被转移到一个带诱导型启动子的表达载体上（图 54.3）。LP-USE 诱变法的第三种应用是可以有效地将任何一个基因上的未知突变转移到它的克隆拷贝或 cDNA 上（标记获救）。在这一操作中，使用目标基因两侧的一对引物，通过 PCR 扩增可将突变从基因组 DNA（或 mRNA）复制下来。目标基因的克隆拷贝或 cDNA 上的相应序列可以利用两侧的 USE 位点进行操作。这些 USE 位点在基因组 DNA 或 mRNA 中是不存在的，所以在 PCR 产物中也不会出现。克隆的基因通过 PCR 产物引导的 DNA 合成可以除去两个 USE 位点，并高效地将突变基因上的任何突变转移到克隆拷贝上（图 54.4），然后可以通过 DNA 测序鉴定突变。由于不止一个基因的克隆拷贝可能存在于表达质粒上，通过上述过程得到的突变基因又可以重新引入细胞中以验证其表型。如果某个基因含有许多外显子但不具备 cDNA，对于那些具备克隆的特定外显子上的突变，可先用 SSCP 分析加以确认[15]，然后扩增带有突变的外显子，将突变转移到外显子的克隆拷贝上进行测序。虽然直接对

PCR 产物进行测序也能鉴定突变，但使用标记获救法有一个好处，那就是可以将获救的突变重新导入细胞进行表型分析。

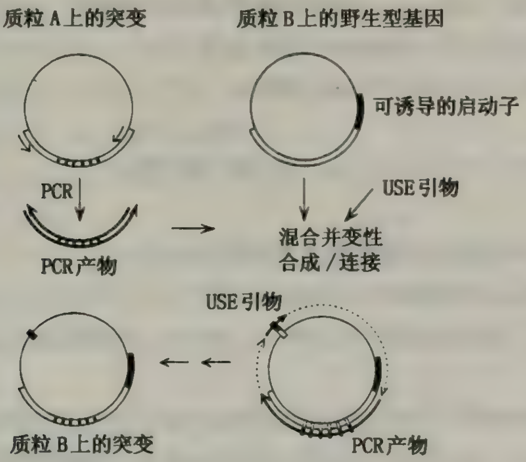


图 54.3　结构域置换。突变（粗短黑线）从一种质粒（A）上的某一基因转移到另一种带诱导型启动子的表达载体（B）上。经变性的突变结构域的 PCR 扩增产物在以环状单链质粒 B 为模板进行第二条链合成时与一个 USE 引物连接到一起。余下步骤同图 54.1。

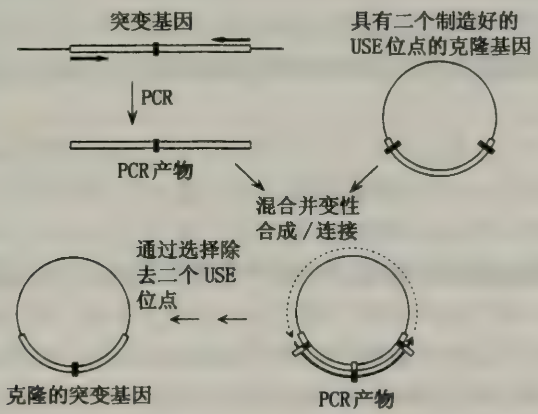


图 54.4　标记获救。一个基因上的突变（粗短黑线）用两个野生型 PCR 引物扩增。PCR 产物引导带有该基因野生型克隆拷贝的质粒模板进行第二条链的合成，该野生型基因两端各有一个人工引入的 USE 位点（粗短黑线）。USE 位点可以通过在天然位点上插入连接片段或由定点诱变产生。通过消除两个 USE 位点的选择过程（如图 54.1 所示）就可得到带有突变基因的质粒。

2. 材　　料

2.1　诱变引物的磷酸化

1）10×激酶缓冲液：700 mmol/L Tris-HCl、pH 7.6，100 mmol/L $MgCl_2$，50 mmol/L

二硫苏糖醇。

2）10 mmol/L ATP：－20℃保存。

3）寡核苷酸诱变引物：100 pmol 寡核苷酸的蒸馏水溶液，或含有连锁的诱变引物的 PCR 产物（约 0.005～1.5 pmol)。(参见注释 1)

4）T4 多核苷酸激酶：10 U/μl，－20℃保存。

2.2 定点诱变

5）具有一个或多个非必需限制酶切位点的质粒 DNA。

6）*E.coli mut* S 菌株，如 BMH71～18 *mut* S[10]。

7）10×复性缓冲液：200 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，100 mmol/L $MgCl_2$，500 mmol/L NaCl。

8）10×合成/连接缓冲液：100 mmol/L Tris-HCl、pH 7.5，dATP、dGTP、dCTP、dTTP 各 5 mmol/L，10 mmol/L ATP，20 mmol/L 二硫苏糖醇。

9）T4 DNA 聚合酶：(10 U/μl)。

10)T4 DNA 连接酶：(400 U/μl)。

11) 10×终止混合液：50% 甘油，0.5% SDS，10 mmol/L EDTA，0.25% 溴酚蓝，0.25%二甲苯青 FF。

12)Sepharose CL-6B：参见第二十七章。

13)制备和转化感受态细胞、质粒 DNA 的限制酶消化以及离心柱层析所需的试剂与设备。

3. 方　　法

3.1 寡核苷酸引物或 PCR 产物的磷酸化（参见注释 2）

1）在 1.5ml 管中加入 2 μl 10×激酶缓冲液，2 μl 10 mmol/L ATP，100 pmol 寡核苷酸（约 0.2 μg 21 个碱基组成的寡核苷酸）或 0.005～1.5 pmol PCR 产物，加水至 20 μl。

2）加入 10 U T4 多核苷酸激酶，37℃保温 2 h。

磷酸化的寡核苷酸或 PCR 产物无须纯化即可直接用于第二条链的合成。

3.2 定点诱变

整个过程分三个阶段：

a. 第二条链的体外合成/连接反应，转化 *E.coli mut* S 菌株，转化子混合培养过夜。

b. 质粒 DNA 纯化，限制酶消化，转化 *E.coli* 正常菌株。

c. 突变质粒的抽提和鉴定。

以下叙述包括用于估计各阶段效率的对照实验。

1) 使诱变引物与靶质粒复性：在 1.5 ml 微型离心管中加入 5 μl 磷酸化了的引物(25 pmol)或 5 μl 磷酸化的 PCR 产物，0.025 pmol 质粒 DNA（约 0.1 μg)，2 μl 10× 复性缓冲液，加水至 20 μl。(参见注释 3)
2) 混匀，100℃煮沸 3 min，立即置于冰浴中 1 min，在微型离心机中离心 5 s 以收集冷凝水滴，置室温 30 min。
3) 在复性反应液中加入 3 μl 10×合成/连接缓冲液、3 U T4 DNA 聚合酶、400 U T4 DNA 连接酶，加水至总体积 30 μl（酶最后加入)，混匀。如果使用寡核苷酸引物，置 37℃保温 30 min；如果使用>1000 bp 的 PCR 产物，则置 37℃保温 5 min（参见注释 4)。
4) 加入 3 μl 10×终止混合液，略加涡旋振动混匀后 65℃保温 5 min 以终止反应。通过 Sepharose CL-6B 离心柱纯化 DNA。
5) 用电穿孔法或其他标准方法转化 *E. coli* BMH 71～18 *mut* S（或其他合适的 *mut* S）菌株（参见注释 5)。将细胞悬浮于 1ml SOC 培养基中，37℃培养 1 h。取 100 μl 细胞悬浮液涂布到一个含相应抗生素的 LB 平皿上，37℃培养过夜以估计转化效率。在剩下的细胞悬液中加入 5 ml 含抗生素的液体 LB，37℃剧烈振荡培养过夜。取十分之一转化混合物涂平皿以测定液体培养物中初级转化子的数目。这一测定非常重要，因为初级转化子的数目决定着下一步质粒 DNA 制备物的最大的复杂性（参见注释 6)。
6) 从 5 ml 培养物制备质粒 DNA（参见第三十一～三十三章)。
7) 在 20 μl 体积中，用识别靶 USE 位点的限制酶切割 0.25 μg 质粒 DNA。取 15 μl 酶切反应物并用等量未切 DNA 作对照，通过琼脂糖凝胶电泳检测酶切情况。酶切过的 DNA 样品中应该看不到或者只看到很少的环状构型（参见注释 7 和 8)。
8) 用一部分酶切过的 DNA 转化正常 *E. coli* 菌株（如 HB101 或 DH5α)。从多个转化子分离质粒 DNA 以检查 USE 位点是否丢失。在那些 USE 位点发生了突变的转化子中，约有 80%会带有我们所期望的非能（被）选择的突变，它们可通过 DNA 测序加以确认（参见注释 9)。

典型情况下，50%～100%的次级转化子在 USE 位点上带有突变（参见注释 10 和 11)。当用寡核苷酸作引物引入所期望的突变时，大约 80%的 USE 位点发生了突变的产物带有所期望的不经选择得来的突变（参见注释 12 和 13)。如果同时用多个引物引入两个或多个不经选择得来的突变，各个突变都将各自以 80%的概率独立发生。如果使用基于 PCR 的方法，USE 位点上带有突变的产物通常会 100%地带有所期望的突变（参见注释 13～17)。

4. 注　　释

(1) 使用多个引物可同时引入多重不经选择得来的突变，但每个引物都必须作为能被选

择的 USE 引物复性到同一条链上。对于 LP-USE 诱变来讲，两个引物必须分别与两条链互补以实现 PCR 扩增。

(2) 3.2. 节步骤 3 中的连接反应要求磷酸化的引物或 PCR 产物。虽然不通过连接反应也能得到突变型，但最好不要这样做，因为即使用 T4 DNA 聚合酶可以避免体外链置换的发生[8,9]，但链置换仍然可能在体内发生。

(3) 这些方法的成功依赖于在体外连接到一起的两个突变在体内的伴同分离。有几个因素会影响连锁突变的形成和稳定。首先，在第二条链合成过程中诱变引物的连锁，要求两个引物复性到同一条模板分子链上并引导 DNA 合成，通过连接封闭切口而形成一条完整的第二链。引物相对于模板的过量有助于两个引物一同复性，通常用 1000:1，但应根据引物与靶序列复性时形成错配的数量和类型加以适当调整。PCR 产物与模板的比率的要求不必那么严格，因为在第二条链合成之前，PCR 过程使经选择的和不经选择的诱变引物连接到一起。有效的 PCR 产物与模板的摩尔比应在 0.1～100:1 范围内。

(4) T4 DNA 聚合酶合成一条完整的第二链，DNA 连接酶封闭切口而产生一个共价闭合的环状双链质粒。在合成/连接反应中加入 T4 的基因 32 蛋白能促进 T4 DNA 聚合酶的作用，这一可有可无的成分对于某些模板-引物组合可能是有帮助的。对于 0.025 pmol 的 5～6 kb 大小的模板，可加入 1.5 μl 新配的 10 倍稀释液（用 TE 稀释；约 15 pmol）。这样能达到大约 50％的饱和度，因为一个基因 32 蛋白单体可结合 10 个核苷酸。DNA 合成还可能受到模板质量及模板或引物的自身复性的影响。

(5) 使用 *E. coli mut* S 菌株是因为它们带有错配修复缺陷，这可提高在宿主细胞中的第一轮质粒复制过程中错配碱基得以伴同分离的概率。然而 *mut* S 菌株也是增变菌株，可能自发地产生一些我们不希望看到的性状，也包括恢复错配修复能力的回复突变，从而降低诱变效率。所以，感受态 *mut* S 细胞应从冷冻保存的菌种制备，不应使用经过反复传代的培养物。在第一次转化中不要采用正常的 *E. coli* 菌株，否则会大幅度降低诱变效率[7]。

(6) 测定液体培养物中初级转化子的数量是非常重要的（3.2 节，步骤 5），这一数量决定着下一步质粒 DNA 制备物的最大的复杂性。因为在这一阶段突变型的比率可以是从 5％到＜1％，在含有不足 100 个初级转化子扩大得来的培养物中可能只有极少或根本没有突变型。值得注意的是，通过过夜培养，从单个初级转化子也能产生达到静止期的培养物，所以不能用已达到静止期的培养物来判断初级转化子的数量。虽然，能够得到足够数量转化子的任何转化方法都可以选用，但用电穿孔法通常能获得最高的转化效率。

(7) 通过筛选排除非突变质粒取决于从初级转化子（或二级转化子，如果要进行第二轮选择的话；参见注释 10）制备得到的质粒 DNA 的完全酶切。最好不要一次酶切大量的 DNA，否则酶切不完全的可能性增加，从而会导致无法接受的高本底非突变质粒。增加限制酶用量可以避免不完全酶切。因为在初级转化子中突变质粒的比率通常很低（1％～5％），几乎所有 DNA 都应被切成线状，所以在溴化乙锭染色的凝胶上一般看不到突变型的（环状构型）DNA。

(8) 从未发现过选择和诱变效率为被消除的限制酶位点的类型（即酶切后生成的末端种

类，包括平末端和 5′或 3′突出末端）或引物位置间的距离所影响的情况。

(9) 在做 DNA 测序分析之前进行限制酶切位点丢失的质粒的筛查，是一个快速而又方便的估计诱变效率的方法。

(10) 如果次级转化子中没有丢失 USE 位点者不足 30%[1]，可通过第二轮选择进行富集。将次级转化子菌落（3.2. 节，步骤 8）悬浮于 5 ml LB 培养基中（无须进一步培养），重复步骤 6～8。当满足下述两个条件时，第二轮筛选会得到最好的结果：(a) 通过对照涂皿计数，推断液体培养物至少由 200 个初级转化子扩大得来（3.2. 节，步骤 5）；(b) 用至少 200 个次级转化子菌落（3.2. 节，步骤 8）的混合物制备质粒 DNA。随着初级或次级转化子数量的减少，分离到同胞质粒的风险增大，于是，增加筛选轮次可能仅仅起着富集那些丢失了 USE 位点的质粒，但并不起着富集带有所期望的突变的质粒的作用。第二轮筛选之所以有效，是因为带有 USE 位点突变的质粒在第一轮筛选中已被富集；而且，从正常 *E. coli* 菌株制备的质粒比从 *mut* S 菌株制备得到的质粒的质量较好，因而更容易被完全酶切。

(11) 另一种降低野生型背景频率的方法是在转化 *mut* S 菌株之前，以及如图 54.1 所示在第二次转化之前，两次施加 USE 选择压力。

(12) 如果能高效地得到经选择得来的(selected)突变，而不经选择得来的(nonselected)突变的得率极低甚至为零，则应增加不经选择的突变引物和经选择的突变引物的比率。

(13) 对于任何引物引导的 DNA 合成反应，低效率的复性或引物延伸都可能带来麻烦。一条链上带有切口的环状质粒变性后能产生所需的单链环状模板，所以无须使用高度超螺旋质粒。不过如果质粒的两条链上都带有切口，就不能产生单链环状模板，因此不要用切口很多的质粒制备模板。

(14) 当用 PCR 产物诱变时，最后的测序分析应覆盖整个扩增区域，因为 PCR 过程中可能会产生一些我们不想要的突变[16]。采用高保真的耐热酶和尽量减少 PCR 循环数可以减少这类不想要的突变。这些突变偶尔也会发生在诱变引物顺序内或其近旁，它们可能由 *mut* S 菌株中残留的倾向错误的修复作用引起[12]。不过所有这些突变都能通过 DNA 顺序分析很容易地被鉴别出来。除上述情况外，这类突变并不常见。

(15) 在确证转染基因上突变的存在时，为了避免扩增出内源基因，应设计一个与载体的顺序互补的 PCR 引物（图 54.2）。

(16) 不带能被选择的突变的 PCR 产物与 USE 引物相连锁的效率取决于 PCR 产物与 USE 引物模板的比率（图 54.3）。PCR 产物与 USE 引物之比以≥1 比较合适。

(17) 如果在单个诱变引物上带有许多突变，得到的产物可能带有部分但不是全部所期望的突变。可能的原因是多个间隔很近的错配形成一个激发 *mut* S 菌株残存错配修复能力的强烈信号。

1）原著此处错误，应为“如果次级转化子中丢失了 USE 位点者不足 30%”。——译者注

参 考 文 献

1. Zoller, M. J. and Smith, M. (1987) Oligonucleotide-directed mutagenesis: a simple method using two oligonucleotide primers and a single-stranded DNA template. *Methods Enzymol.* **154,** 329–350.
2. Kramer, W. and Fritz, H.-J. (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA. *Methods Enzymol.* **154,** 350–367.
3. Kunkel, T. A., Roberts, J. D., and Zakour, R. A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154,** 367–382.
4. Carter, P. (1987) Improved oligonucleotide-directed mutagenesis using M13 vectors. *Methods Enzymol.* **154,** 382–403.
5. Smith, M. (1985) In vitro mutagenesis. *Annu. Rev. Genet.* **19,** 423–462.
6. Kunkel, T. A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82,** 488–492.
7. Lewis, M. K. and Thompson, D. V. (1990) Efficient site directed *in vitro* mutagenesis using ampicillin selection. *Nucleic Acids Res.* **18,** 3439–3443.
8. Masumune, Y. and Richardson, C. A. (1971) Strand displacement during deoxyribonucleic acid synthesis at single strand breaks. *J. Biol. Chem.* **246,** 2692–2701.
9. Nossal, N. G. (1974) DNA synthesis on a double-stranded DNA template by the T4 bacteriophage DNA polymerase and the T4 gene 32 DNA unwinding protein. *J. Biol. Chem.* **249,** 5668–5676.
10. Zell, R. and Fritz, H.-J. (1987) DNA mismatch-repair in *Escherichia coli* counteracting the hydrolytic deamination of 5-methyl-cytosine residues. *EMBO J.* **6,** 1809–1815.
11. Deng, W. P. and Nickoloff, J. A. (1992) Site-directed mutagenesis of virtually any plasmid by eliminating a unique site. *Anal. Biochem.* **200,** 81–88.
12. Ray, F. A. and Nickoloff, J. A. (1992) Site-specific mutagenesis of almost any plasmid using a PCR-based version of unique-site elimination. *Biotechniques* **13,** 342–346.
13. Higuchi, R. (1989) Using PCR to engineer DNA, in *PCR Technology* (Erlich, H. A., ed.), Stockton, New York, pp. 61–70.
14. Rubin, J. B., Verselis, V. K., Bennett, M. V. L., and Bargiello, T. A. (1992) A domain substitution procedure and its use to analyze voltage dependence of homotypic gap junctions formed by connexins 26 and 32. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89,** 3820–3824.
15. Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., and Hayashi, K. (1989) Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* **5,** 874–879.
16. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., and Erlich, H. A. (1988) Primer–directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239,** 487–491.

第五十五章　应用含尿嘧啶的噬粒为模板的定点诱变法

Michael K. Trower

1. 引　　言

定点诱变是一种非常有用的手段，使用这项技术可以向靶 DNA 分子引进特定的变异以便进行结构-功能研究，或是制造或消除限制性核酸内切酶作用位点。已有几种寡核苷酸介导的诱变方法见诸文献，它们都能通过筛除野生型 DNA 分子而使那些所需的突变的分子得以富集[1~4]。总的说来，这些方法还有一些欠缺，包括需要多重酶促反

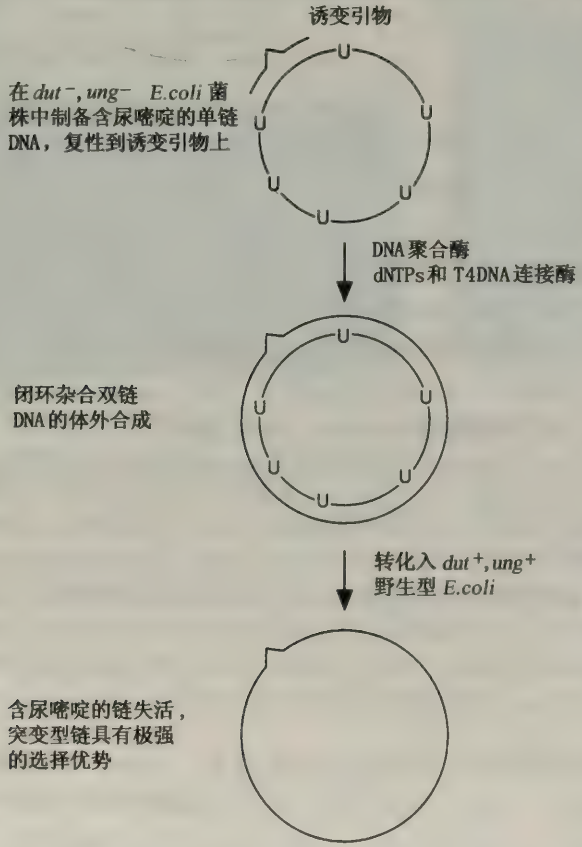


图 55.1　基于 Kunkel 法的定点诱变。以从 *E. coli dut*⁻，*ung*⁻宿主制备的含尿嘧啶的 ssDNA 为模板，以诱变寡核苷酸为引物，通过 DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶的作用，体外合成一条异源 dsDNA。将该 dsDNA 转化到 *E. colidut*⁺，*ung*⁺野生型菌株中。通过含尿嘧啶的 DNA 链在野生型宿主中的选择性失活，新合成的诱变 DNA 链得以富集。

应步骤，需要沉淀 DNA，需要合适的限制酶切位点以及需要特殊的载体。Kunkel 等介绍的一种巧妙的定点诱变方法可以避免上述问题，同时能高效地得到含所需的突变的 DNA 分子[5,6]，其整个过程如图 55.1 所示。这一方法基于下述发现：缺少两种关键性的酶，dUTPase 和尿嘧啶 N-糖基化酶的 *E. coli* 菌株在合成 DNA 时，会在少量胸腺嘧啶位置上掺入尿嘧啶。从这种 dut^-，ung^- 宿主菌株制备的含尿嘧啶的单链 DNA（ssDNA）可以用作模板，在一个具有诱变作用的寡核苷酸引物的发动下通过 DNA 体外合成产生一条互补链。这一异源双链被转化到一个野生型 *E. coli* 菌株（dut^+，ung^+）中后，含有尿嘧啶的模板链选择性地失活，最后得到的主要是事前设计的突变的子裔。下面介绍的是一种基于 Kunkel 原理的实验步骤，但所用的单链 DNA 来自一种噬粒而不是更常用的 M13 噬菌体。其明显的优点是减少了定点诱变过程所需的亚克隆的数量。

2. 材　　料

除非另有说明，所有溶液均可室温保存。

1）*E. coli* 菌株：

a. 带有 F′附加体的 dut^-，ung^- 菌株 CJ236，或其他具有相同基因型特点的宿主细菌。

b. 野生型 dut^+，ung^+ 菌株，如 DH5α，JM109，NM522，TG1，或 XL1-Blue。野生型宿主无须带有 F′附加体。

2）T4 多核苷酸激酶（10 U/μl）。

3）10× T4 多核苷酸激酶缓冲液：0.5 mol/L Tris-HCl、pH 7.5，0.1 mol/L $MgCl_2$，50 mmol/L DTT，0.5 mg/ml 无核酸酶的牛血清白蛋白（BSA）。-20℃保存。

4）Klenow 片段：DNA 聚合酶 I 的大片段（5U/μl）。

5）10× Klenow 缓冲液：0.5 mol/LTris-HCl、pH 7.4，0.1 mol/L $MgCl_2$，10 mmol/L DTT，0.25mg /ml 无核酸酶的 BSA。-20℃保存。

6）dNTP 母液：dATP，dCTP，dGTP 和 dTTP 的浓度各为 4 mmol/L。-20℃保存。

7）ATP：10 mmol/L 溶液。-20℃保存。

8）T4 DNA 连接酶：400 U/μl。

9）诱变引物（参见注释 1）：0.5 μmol/L 的人工合成寡核苷酸。

3. 方　　法

诱变过程中须要制备含尿嘧啶的 ssDNA 模板。*E. coli* CJ236 菌株是一个理想的宿主，因为它既是 dut^-，ung^- 菌株又带有使它可被辅助噬菌体感染的 F′附加体。

1）用 10～50 ng 插入了目标 DNA 序列的噬粒 DNA 转化 CJ236 菌株，在适当的培养基上选择转化子（参见注释 2）。用第四十四章介绍的方法制备噬粒 ssDNA（参见注释 3）。

2）混合 1.0 μl 10× T4 多核苷酸激酶缓冲液，1.0 μl ATP，1.0 μl 诱变引物，6.5 μl 蒸馏水和 0.5 μl T4 多核苷酸激酶。37℃保温 60 min，然后置 70℃中 5 min 以终止激酶的作用。

3）在被磷酸化了的寡核苷酸引物仍处于 70℃时，加入 2 μl 含尿嘧啶的 ssDNA 模板（约 20～50 ng 的 DNA），将反应管放在 200～300 ml 的 70℃水浴中，自然冷却至室温。
4）加入 2.0 μl 10×Klenow 聚合酶缓冲液，1.0 μl dNTP 母液，2.0 μl ATP，3.0 μl 蒸馏水，1.0 μl Klenow 酶和 1.0 μl T4 DNA 连接酶，16℃保温过夜（参见注释 4）。
5）取 1～10 μl 延伸/连接反应液转化感受态野生型 *E. coli dut*$^+$，*ung*$^+$菌株，将细胞涂布到选择性平皿上。

转化后，一般能在平皿上得到十个到几百个菌落。典型情况下，诱变位点的掺入效率高于 50%（参见注释 5～8），直接通过 DNA 测序检查少数菌落就能找到所设计的突变产物。而且，如果引入的变异能生成或消除一个限制酶位点，就可以先如图 55.2 所示那样进行限制酶位点分析。所有定点变异，包括那些涉及限制酶位点的变异，都应经 DNA 测序加以确证（参见注释 9）。

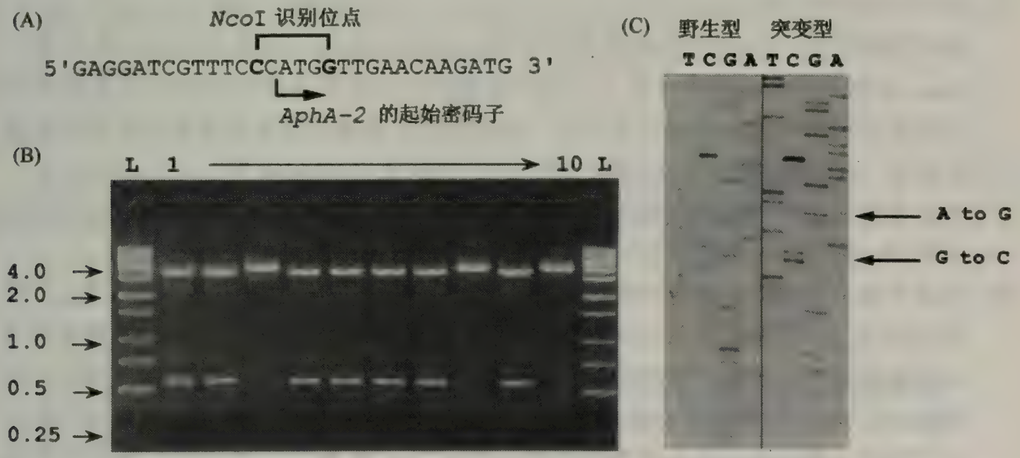


图 55.2　(A) 设计一个寡核苷酸诱变引物，用于向 Tn5 *AphA*-2（卡那霉素磷酸转移酶）基因的起始密码子位置上引入一个限制酶 *Nco*I 识别位点（CCATGG）。其结果是使野生型的这一顺序发生两处变化（黑体字母）：*AphA*-2 基因的起始密码的 −2 位置的 G→C 和 +4 位置的 A→G。这一 30 个碱基的寡核苷酸从 5′读向 3′的两个点突变的外侧各有 12 个碱基。图中箭头表示 *AphA*-2 结构基因的转录方向。(B) 进行定点诱变后，从转化平皿上几百个菌落中选取 10 个以制备质粒 DNA。其中 7 个样品用 *Nco*I 酶切后产生 3.75 kb 和 560 bp 的两个片段（第 1，2，4～7 及 9 泳道），这与向载体上引进了第二个 *Nco*I 识别位点的预期结果一致。那些不带有所设计的突变的质粒被 *Nco*I 切割后产生一条 4.3 kb 的线性片段（第 3，8 和 10 泳道）。L：1 kb 的阶梯状相对分子质量标准（Stratagene）。(C) 野生型和突变型质粒 DNA 的测序分析。用复性到 *AphA*-2 基因起始密码子上游 55 个碱基处的寡核苷酸（17 个碱基）作引物，得到野生型和带有 *Nco*I 突变的载体的 DNA 序列。

4. 注　　释

(1) 诱变引物应由一个错配区域及其两侧与模板互补的序列组成，以确保引物能与指定的靶序列有效地复性。错配区可以是插入、缺失、替换或几者的结合。若是引入一个或两个突变，突变位点两侧各有 10 个互补碱基通常就足够了。如果两侧区域均富含 A 和 T，或者要对靶序列做很大的改变，两侧的互补碱基数可以增加到 15 个

或更多。只要可能，应尽量在引物的 5′端带上一个或多个 G 或 C 以避免引物在延伸过程之后被 DNA 聚合酶置换掉，即使必须增加引物的长度也在所不惜。引物不能包含反向重复序列，否则会形成引物二聚体从而妨碍引物与靶序列的复性。可以大胆设计能使相当大的靶 DNA 区域环出（loop out）的诱变引物。例如，使用上面介绍的方法，可以将人类巨细胞病毒 IE_1 编码序列中的一个 237 bp 的区域定点缺失掉，所用引物由 30 个碱基组成，缺失位点两侧各 15 个碱基（Stephen Walker，私人通讯）。

(2) CJ236 和野生型宿主的感受态细胞可用 Hanahan 介绍的冻存缓冲液法（FSB）制备[7]；（参见第二十九章）。用此法制备的感受态细胞可分装保存于 -70℃，随时取用，非常方便。

(3) Kunkel[5,6]在制备 M13 ssDNA 的过程中添加了尿嘧啶核苷（0.25 μg/ml），但本文作者发现对于制备噬粒 ssDNA 来说，这样做是没有必要的。

(4) 在本方法中用于引物延伸的 DNA 聚合酶是 Klenow 片段，它没有对 ssDNA 的 5′核酸外切酶活性，所以不会降解诱变引物。也可以采用 T4 或 T7 DNA 聚合酶。与 Klenow 相比，它们的优点是工作效率较高，所以使用这两种酶可以显著缩短引物延伸反应所需时间。然而作者发现，在最终能分离得到带有所需定点诱变的克隆这一点上，Klenow 是更可靠的酶，所以作者建议使用 Klenow 酶。

(5) 如果在转化平皿上没有菌落出现，通常可归因于宿主细胞的低感受态。在任何转化工作中，都应同时设置质粒对照以确定所用的宿主细胞是处于感受态。

(6) 转化平皿上无菌落生长也可能因为在前一步反应中没有生成异源双链 DNA。在这种情况下，首先应证实从 ssDNA 模板生成 dsDNA 的过程确已完成；方法是在 1%琼脂糖凝胶上比较寡核苷酸的延伸/连接反应液样品和 ssDNA 模板对照样品。正常情况下，在延伸/连接反应液样品的电泳图谱上看不到噬粒的 ssDNA 条带而能看到一个新的、亮度较高且电泳速度明显低于 ssDNA 模板样品的条带。这条新带应该或是松弛的闭合环状 dsDNA（Ⅳ型）的异源双链，或是没有连接好的带有切口的环状 dsDNA（Ⅲ型）。

如果在延伸/连接反应液样品的电泳图上只有一条噬粒 ssDNA 带，说明异源双链 DNA 并未合成。这可能由下列许多因素之一引起：DNA 聚合酶失去活力或反应体系中污染有酶抑制物；诱变引物未能与模板复性或模板带有二级结构如发夹环。如果是第一种情况，应换用新的 Klenow 酶，核实诱变引物的稀释度，重新沉淀处理 ssDNA 模板以除去所有污染物。为了确证诱变寡核苷酸已复性到模板的正确位置上，可以将它作为测序引物，对含有尿嘧啶且含有所克隆的靶序列的噬粒 ssDNA 测序。得到的 DNA 序列应刚好位于诱变引物结合位点的下游。

(7) 在 T4 DNA 连接酶不能有效地工作以去除新合成的链与诱变寡核苷酸 5′端之间的切口的情况下，理应仍然可以分离得到突变菌落，虽然效率可能较低。宿主菌的 DNA 修复系统可在体内完成突变链的环化。

(8) 导致低诱变效率的可能原因包括：ssDNA 模板上无尿嘧啶，因而在转化入野生型宿主中后不能失活；进行中的 DNA 聚合酶对诱变寡核苷酸的置换作用或者噬粒 ssDNA制备物中的杂质 DNA 作为引物引发了模板进行 DNA 合成。

用 10 ng ssDNA 模板同时转化 CJ236 和野生型*E. coli dut*⁺，*ung*⁺菌株可以检查模板上尿嘧啶的掺入情况。由于含尿嘧啶链的选择性降解，在野生型菌株上观察到的转化效率应该比 CJ236 菌株低 10^5 倍以上。

在引物的 5′端增加与模板互补的 G 或 C 碱基的数量可以减少对引物的置换。另外，可以用 T4 DNA 聚合酶或天然的 T7 DNA 聚合酶（非测序酶）代替 Klenow 酶，因为这两种酶没有链置换活性。

由模板中的杂质 DNA 启动的 DNA 合成可通过下述方法检出：在不加入诱变引物的情况下进行延伸/连接反应，如果噬粒 ssDNA 也被转变为 dsDNA 产物，就应重新制备模板。

(9) 整个定点诱变过程，包括通过测序来鉴定所设计的突变克隆，可以在一个星期内完成。而且，每一轮反应所需模板量很少，每次反应仅耗去含尿嘧啶的 ssDNA 的 1/25，一次制得的含尿嘧啶的 ssDNA 可多次用于向所克隆的插入片段中引进其他突变，从而可以节省一天时间。

致　谢

感谢剑桥大学医学系的 Sydney Brenner 给了作者设计这一方法的机会。作者还得到来自 E. I. du Pont de Nemours and Co. Inc., Wilmington, DE. 的资助。

参 考 文 献

1. Vandeyar, M. A., Weiner, M. P., Hutton, C. J., and Batt, C. A. (1988) A simple and rapid method for the selection of oligodeoxynucleotide-directed mutants. *Gene* **65,** 129–133.
2. Stanssens, P., Opsomer, C., McKeown, Y. M., Kramer, W., Zabeau, M., and Fritz, H.-J. (1989) Efficient oligonucleotide-directed construction of mutations in expression vectors by the gapped duplex DNA method using alternating selectable markers. *Nucleic Acids Res.* **17,** 4441–4454.
3. Lewis, M. K. and Thompson, D. V. (1990) Efficient site directed *in vitro* mutagenesis using ampicillin selection. *Nucleic Acids Res.* **18,** 3439–3443.
4. Sayers, J. R., Schmidt, W., Wendler, A., and Eckstein, F. (1988) Strand specific cleavage of phosphorthioate containing DNA by reaction with restriction endonucleases in the presence of ethidium bromide. *Nucleic Acids Res.* **16,** 803–814.
5. Kunkel, T. A. (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82,** 488–492.
6. Kunkel, T. A., Roberts, J. D., and Zakour, R. A. (1987) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Meth. Enzymol.* **154,** 367–382.
7. Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli,* in *DNA Cloning: A Practical Approach,* vol. 1 (Glover, G. M., ed.), IRL, Oxford, pp. 109–135.

第五十六章　无细胞系统中的 mRNA 翻译——兔网织红细胞裂解液

Louise Olliver, Charles D. Boyd

1. 引　　言

体外翻译系统的创建大大促进了对特异性 mRNA 分子及其所编码的蛋白质的鉴定。这些无细胞的提取物含有蛋白质合成所需的各种细胞组分，即核糖体、tRNA、rRNA、各种氨基酸、起始因子、延伸因子、终止因子以及能量产生系统[1]。使用下列各种细胞的提取物都能对异源 mRNA 进行高效而忠实的翻译：HeLa 细胞[2]、Krebs II 腹水瘤细胞[2]、小鼠 L 细胞[2]、小鼠和大鼠的肝细胞[3]、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞[2]、兔网织红细胞裂解液[2,4]以及黑麦胚[5]和小麦胚乳[6]。与非洲爪蟾卵母细胞体内翻译系统相比，无细胞系统中的翻译更简单、快速（只需 60 min，而前者需 24 h）。

mRNA 翻译产物的生成可通过放射性标记氨基酸的掺入来检测，一般选择那些在产物蛋白中含量丰富的氨基酸加以放射性标记。翻译产物的分析通常包括特异性免疫沉淀[7]，以及随后的聚丙烯酰胺凝胶电泳[8]及荧光显影[9]等过程（见图 56.1）。

体外翻译系统在 mRNA 的种类鉴定及其蛋白质产物的定性研究、转录和翻译调控的研究以及在加入到翻译反应体系中的微粒体膜对伴同翻译的分泌蛋白加工过程[10,11]的研究中都起着重要的作用。本章介绍用于 mRNA 体外翻译的兔网织红细胞裂解液系统。

虽然网织红细胞裂解液中内源 mRNA 的含量已经很低，但还可以使它进一步减少以增加翻译过程对外源 mRNA 的依赖性。用一种被钙离子激活并被随后加入的 EGTA 灭活的核酸酶处理便能达到这一目的[4]。这样一来，这系统的体内环境在某种程度上已被破坏并且变得对钙离子十分敏感。这一系统对外源 mRNA 引导的放射性氨基酸掺入翻译产物来说，却已经成为最有效的体外翻译系统，因此特别适用于翻译产物的研究。不过它对某些代谢物的消耗以及氯高铁血红素和双链 RNA 等起调节作用的因素很是敏感，因而可用来研究这些因素在不同 mRNA 的翻译调控中的作用。网织红细胞裂解液虽然是一个很有效的体外翻译系统，但不同种类的 mRNA 在其中竞争翻译起始的情形可能与在体内环境中有所不同，因此各种产物的合成可能也不按体内比例进行；相比之下，麦胚提取物无细胞系统（参见第五十七章）能更忠实地反映体内情形。经核酸酶处理过的兔网织红细胞裂解液无细胞系统的试剂盒可从许多供应厂商购得。

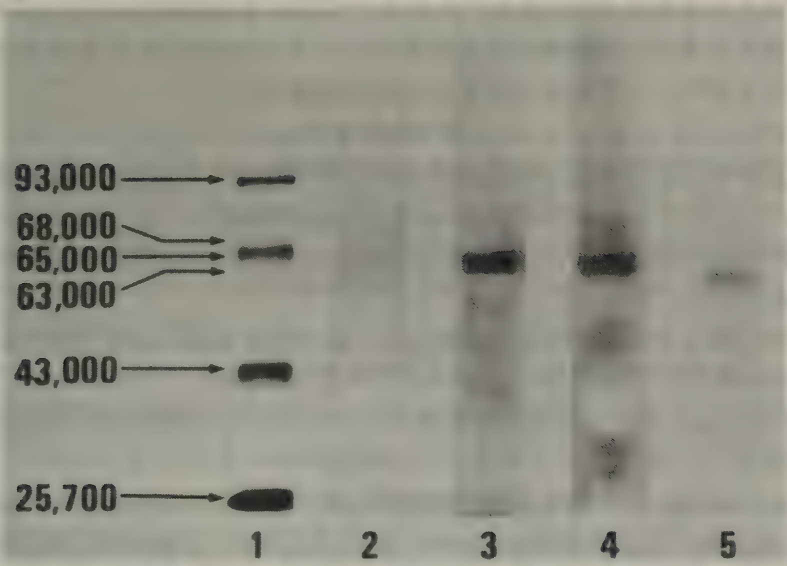


图 56.1 体外翻译产物的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。在一依赖 mRNA 的网织红细胞裂解液无细胞体系中，从外源 mRNA 得到体外翻译产物。经 8% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后，通过荧光显影分析放射性蛋白质产物。泳道 1：已知相对分子质量的 [^{14}C] -标记的蛋白质；磷酸化酶 A（93K）、牛血清白蛋白（68K）、卵清蛋白（43K）和 α-胰凝乳蛋白酶原（25.7K）。泳道 2～5 依次是下列 mRNA 用 [^{3}H] -脯氨酸标记的翻译产物：泳道 2：网织红细胞裂解液的内源 mRNA；泳道 3：0.3 μg 来自小牛颈部韧带经 polyA^{+} 化的 RNA；泳道 4：0.3 μg 与泳道 3 相同的 RNA，翻译产物经 5 μl 羊抗人原弹性蛋白血清免疫沉淀；泳道 5：0.3 μg 与 泳道 3 相同的 RNA，翻译产物经 0.3 A_{260} nm 微粒体膜进行共翻译加工。

2. 材 料

所有体外翻译组分均应 -70℃ 保存。裂解液、微粒体膜和 [^{35}S] -标记的氨基酸对温度特别敏感，应以适当体积分装保存于 -70℃ 并尽量减少冻融过程；溶液在贮存前用干冰或液氮快速冷冻。

1）叶酸溶液：1 mg/ml 叶酸，0.1 mg/ml 维生素 B_{12}，0.9%（w/v）NaCl、pH 7.0；用 0.45 μm 滤膜过滤，分装保存于 -20℃。

2）苯肼溶液：2.5%（w/v）苯肼，0.9 %（w/v）碳酸氢钠，用 NaOH 调 pH 值至 7.0。按一次使用量分装保存于 -20℃，保存期不超过一周。融化后未用完的溶液应丢弃。肼的降解会使溶液的稻草色加深。

3）生理盐水：0.14 mol/L NaCl，1.5 mmol/L $MgCl_2$，5 mmol/L KCl。4℃ 保存。

4）1 mmol/L 氯高铁血红素。

5）0.1 mol/L $CaCl_2$。

6）7500 U/ml 微球菌核酸酶的灭菌水溶液。-20℃ 保存。

7）兔网织红细胞裂解液：基本上按照 Pelham 和 Jackson 介绍的方法[4]制备而成。第一天给兔作 1 ml 叶酸溶液的肌肉注射，以后每天按 0.25 ml/kg 注射一次苯肼溶液，

共注射 6 次（参见注释 1）使兔发生贫血。当网织红细胞计数达到至少 80%时，于第七或第八天通过心脏穿刺将血液收集到一只含有大约 3000 U 肝素的 200 ml 离心管中，充分混匀。以下制备过程应于 24℃ 中继续进行。

a. 血液在 2℃ 以 120 *g* 离心 12 min，抽气吸除血浆。

b. 血细胞重新悬浮于 150 ml 冰镇生理盐水中，以 650 *g* 离心洗涤 5 min，重复三次。

c. 轻轻地转动沉淀物，然后转移到 Corex 管中（装到半满）。加入等体积生理盐水，轻轻地悬浮细胞，然后再在 2℃ 以 1020 *g* 离心 15 min 以收集沉淀。用真空泵吸除淡黄色的白细胞表层。

d. 置冰浴中，加入等体积冰镇灭菌去离子水，在涡旋振荡器上剧烈振荡 30 s 以裂解细胞（参见注释 2），立即在 2℃ 以 16 000 *g* 离心 18 min。

e. 于 4℃ 小心吸取上清液（沉淀物为各种膜和细胞碎片），分装成约 0.5 ml/管，用液氮快速冷冻。

氯高铁血红素应根据微球菌核酸酶消化情况在 0～1000 μmol/L 之间决定它的最适浓度，混合477.5 μl 裂解液、5 μl 0.1 mol/L $CaCl_2$和5 μl 核酸酶(终浓度75 U/ml)。取 97.5 μl 的这一混合液与 2.5 μl 待测浓度的氯高铁血红素溶液一起于 20℃ 保温 20 min，然后加 4 μl 0.05 mol/L EGTA 溶液以终止酶反应（参见注释 3）。在标准的无细胞抽提液中测得最高翻译活性（放射性氨基酸的掺入量）（见第 3 节）的氯高铁血红素的浓度就是它的最适浓度。一般用 25 μmol/L 可以保证有效的翻译起始。

裂解液对乙醇、去污剂、金属和盐，尤其是钙离子极为敏感。于 -70℃ 保存，网织红细胞裂解液可保持活性 6 个月以上。

8) [^{3}H] 或 [^{35}S] 标记的 L-氨基酸。为了检测翻译产物，必须向翻译反应体系中加入一种高比活的放射性标记氨基酸（140 Ci/mmol [^{3}H] 标记的或约 1 Ci/mmol [^{35}S] 标记的氨基酸）。应选择在目的产物蛋白中含量丰富的氨基酸加以放射性标记。放射性氨基酸最好是水溶液；若 pH 值偏低，应用 NaOH 调至中性；用冷冻干燥法除尽乙醇，并且应检测溶剂对裂解液活性的影响。[^{35}S] 标记的氨基酸很容易降解成亚砜类物质，应分装保存于 -70℃ 以避免亚砜类物质对翻译过程的影响。

9) 信使 RNA。有多种方法可用来从各种组织中提取总 RNA（参见第一和第十六章）。RNA 于灭菌的蒸馏水中置 -70℃ 保存可保持稳定一年以上。应避免离子、金属和去污剂的污染。

可用氯仿/丁醇（4:1）抽提去除酚，可通过含 0.4 mol/L 醋酸钾（pH 6.0）的乙醇沉淀 RNA 以去除盐；乙醇应用冷冻干燥法去除。用于翻译的贮存液的合适浓度为 1.5 mg/ml 总 RNA 或 150 μg/ml polyA$^+$ RNA。

10) 翻译混合液：250 mmol/L HEPES、pH 7.2，400 mmol/L KCl，除放射性标记氨基酸外的 19 种氨基酸各 500 mmol/L；100 mmol/L 磷酸肌酸。

11) 20 mmol/L 醋酸镁、pH 7.2。

12) 2.0 mol/L 醋酸钾、pH 7.2。

13) 灭菌蒸馏水。

采用无菌操作，为避免 RNase 污染，玻璃器皿须经热处理(250℃，12 h)；对于热敏感

材料可先用焦碳酸二乙酯处理，然后用蒸馏水漂洗。整个过程都应戴灭菌手套操作。

3. 方　　法

体外翻译最好在经高压灭菌过的微型塑料离心管（1.5 ml）中进行；用干热培养箱提供恒温环境比用水浴好。所有加样操作都应在冰上进行。

1）在冰上向一只反应管中依次加入 0.7 μl 灭菌蒸馏水，1.3 μl 2.0 mol/L 醋酸钾（参见注释 4），5 μl（10～50 μCi）放射性标记氨基酸（参见注释 5）和 3 μl 翻译混合液，涡旋振荡混匀。置冰上的每一管中分装 10 μl（参见注释 6）。

2）加入 10 μl（300 mg[1]）总 RNA（参见注释 7 和 8）。设置一不加外源 mRNA 的对照反应以检查是否有残留的网织红细胞内源 mRNA 被翻译。

3）最后加入 10 μl 裂解液以启动翻译过程。如果要对翻译产物进行伴同翻译的加工，则同时加入 0.5 A_{260}nm U 微粒体膜（参见注释 9 和 10）。

4）轻轻地涡旋振荡混匀后，于 37℃ 保温 60 min。将反应管置冰上以停止反应（参见注释 6）。

5）mRNA 指导的放射性氨基酸掺入翻译产物的情况可通过测定酸沉淀计数值来检查。在保温开始和结束时，各取 5 μl 反应液滴到两张玻璃纤维滤膜上，空气干燥后将滤膜依次放入下列溶液中处理，溶液用量为每张滤膜 10 ml。

　a. 10%（v/v）预冷的三氯醋酸（TCA），冰上放置 10 min。

　b. 5%（v/v）TCA，煮沸 15 min 以降解氨基酸-tRNA 复合物。

　c. 5%（v/v）预冷的 TCA，冰上放置 10 min。

　依次用 95%（v/v）乙醇、50%（v/v）乙醇/50%（v/v）丙酮和 100%（v/v）丙酮洗涤滤膜。80℃ 烘干 30 min 后将滤膜浸入 5 ml 以甲苯为溶剂的闪烁液中，用闪烁计数器测定被 TCA 沉淀的放射性强度。

　外源 mRNA 刺激的翻译能使[^{3}H]-或[^{35}S]-标记氨基酸的掺入量比背景值高出 5～30 倍。

6）向剩下的 20 μl 翻译体系中加入等体积的 2%（w/v）SDS，20%（w/v）甘油，0.02%（w/v）溴酚蓝和 1 mol/L 尿素，再加入二硫苏糖醇（DTT）至终浓度为 0.1 mol/L。95℃ 加热 6 min，自然冷却至室温后在适当浓度（6%～17%）的聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳，电泳后就可以在荧光谱上看到凝胶上的放射性部位（图56.1）。

4. 注　　释

（1）为使兔发生最大程度的贫血，可在第 3 天减少苯肼注射剂量，以后几天中增加剂量。网织红细胞计数通过下述过程测定：

　a. 向 100 μl 血液中加入 20 μl 含 0.1% 肝素的生理盐水。

　b. 取 50 μl 血液肝素，加入等体积含 1%（w/v）甲苯基亮蓝，0.6%（w/v）柠檬

1）此处有明显错误，疑是“300 ng”的误排。——译者注

酸钠和 0.7%（w/v）NaCl 的溶液，37℃保温 20 min。

c. 在显微镜下观察到的网织红细胞呈较大圆形，内含蓝色颗粒；而红细胞则较小，呈卵形，无颗粒。

(2) 裂解网织红细胞所需灭菌水的体积（以毫升计）与管中沉淀物的质量（以克计）相等。

(3) 裂解液中的内源 mRNA 被由钙离子激活的核酸酶降解，随后加入的 EGTA 使该酶失活。所以裂解液对钙离子十分敏感，应避免向反应体系中引进钙离子以免外源 mRNA 被激活的核酸酶降解。

(4) 钾离子的最适浓度随所用的 mRNA 种类的不同而变化，范围在 30～100 mmol/L 之间，应在正式进行翻译之前确定下来。另外，不同的 mRNA 对镁离子的要求也可能不一样，常用的镁离子浓度范围是 0.6～1.0 mmol/L。

(5) 如果放射性氨基酸的比活高于第二节所说的标准，可能会导致该种氨基酸的耗尽，结果对翻译产生抑制作用。

(6) 剧烈的振荡会降低翻译效率，所以在制备反应混合物时应轻轻地混匀。

(7) 在进行正式的翻译之前，应在维持其他条件不变的情况下改变 mRNA 的用量以确定其最适浓度。注意避免 mRNA 的过量；polyA^{+} mRNA 的用量超过 1 μg 就会对翻译产生抑制作用。

(8) 在加入反应体系之前，mRNA 经 70～80℃热处理 1 min 并随后于冰浴中快速冷却，这一处理可以提高富含 GC 的 mRNA 的翻译效率；例如，经热处理的弹性蛋白 mRNA 的翻译效率，按翻译产物中的掺入的同位素计比未经处理者高 100%[12]。

(9) 伴同翻译的加工产物可通过向翻译反应体系中加入狗胰腺微粒体膜来检出。这种膜可以用 Jackson 和 Blobel 介绍的方法[11]自行制备，也可与翻译试剂盒一起向厂商订购。微粒体膜应分装成约 5 A_{260}nm U 于 20 mmol/L HEPES（pH 7.5）中置 −70℃保存，避免反复冻融。

(10) 在某些情况下，向反应体系中加入约 0.4 mmol/L 亚精胺可提高翻译效率[12]，可能因为它对有关的核酸具有稳定作用。但这种效应也可能随不同的裂解液样品而异，如有必要，对不同的裂解制备物应分别确定亚精胺的最佳用量。

参 考 文 献

1. Lodish, H. F. (1976) Translational control of protein synthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **45,** 39–72.
2. McDowell, M. J., Joklik, W. K., Villa-Komaroff, L., and Lodish, H. F. (1972) Translation of reovirus messenger RNAs synthesized in vitro into reovirus polypeptides be several mammalian cell-free extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **69,** 2649–2653.
3. Sampson, J., Mathews, M. B., Osborn, M., and Borghetti, A. F. (1972) Hemoglobin messenger ribonucleic acid translation in cell-free systems from rat and mouse liver and Landschutz ascites cells. *Biochemistry* **11,** 3636–3640.
4. Pelham, H. R. B. and Jackson, R. J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* **67,** 247–256.

5. Carlier, A. R. and Peumans, W. J. (1976) The rye embryo system as an alternative to the wheat-system for protein synthesis in vitro. *Biochem. Biophys. Acta* **447,** 436–444.
6. Roberts, B. E. and Paterson, B. M. (1973) Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70,** 2330–2334.
7. Kessler, S. W. (1981) Use of protein A-bearing staphylococci for the immunoprecipitation and isolation of antigens from cells, in *Methods in Enzymology* (Langone, J. J. and Van Vunakis, H., eds.), Academic, New York, pp. 441–459.
8. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227,** 680–685.
9. Banner, W. M. and Laskey, R. A. (1974) A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* **46,** 83–88.
10. Shields, D. and Blobel, G. (1978) Efficient cleavage and segregation of nascent presecretory proteins in a reticulocyte lysate supplemented with microsomal membranes. *J. Biol. Chem.* **253,** 3753–3706.
11. Jackson, R. C. and Blobel, G. (1977) Post-translational cleavage of presecretory proteins with an extract of rough microsomes, from dog pancreas, with signal peptidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74,** 5598–5602.
12. Karr, S. R., Rich, C. B., Foster, J. A., and Przybyla, A. (1981) Optimum conditions for cell-free synthesis of elastin. *Coll. Res.* **1,** 73–81.

第五十七章　无细胞系统中的 mRNA 翻译——麦胚提取物

Louise Olliver，Anne Grobler-Rabie，Charles D. Boyd

1. 引　　言

麦胚提取物体外翻译系统已被广泛应用于病毒和真核细胞 mRNA 在异种无细胞体系中的有效而忠实的翻译[1~9]。就翻译产物的得率而言，麦胚提取物不如大多数网织红细胞裂解液有效，但它却具有下述优点：

①各种 mRNA 在其中竞争翻译的情形更接近于体内环境，所以麦胚提取物更适用于翻译调控的研究[1]。

②内源 mRNA 含量和内源核酸酶活力都特别低[10]，所以无须再用依赖钙离子的核酸酶处理。这样，体内环境受到较少的破坏，钙离子污染的危害性也大为减小。减少内源 mRNA 的干扰对各种大小的外源 mRNA 翻译产物的分析鉴定也更简单易行。

③翻译产物没有翻译后修饰过程，因此所研究的是最初翻译产物；虽然也可以向反应体系中加入微粒体膜以对产物进行翻译后加工。

④对不同大小的 mRNA 模板，可通过改变离子环境来优化反应条件[2]（参见注释 1）。

加入一个由 ATP、GTP、磷酸肌酸和肌酸激酶组成的能量发生系统能使这一体系获得最高的翻译活性[3]。麦胚可以购买，且很便宜（参见注释 2）；提取物的制备简单，快速，得率高。市场上也有麦胚提取物试剂盒供应。

2. 材　　料

麦胚体外翻译系统的组分对温度敏感，须以适当体积分装，于 -70℃ 保存并尽量减少冻融次数。整个过程都应在灭菌条件下进行。为了防止 RNase 污染，所用器材须经高温处理（250℃，8 h），或先经焦碳酸二乙酯处理，然后用灭菌蒸馏水彻底清洗。

1）麦胚提取物：基本上按照 Roberts 和 Paterson 介绍的方法制备[4]。制备过程须在 4℃ 进行；最好使用塑料容器，因为起始因子容易黏着在玻璃器皿上。将新鲜麦胚（约 5g）（参见注释 2）与等质量的沙粒以及 28 ml 逐渐加入的下列各物：20 mmol/L HEPES（pH 7.6）、100 mmol/L KCl、1 mmol/L 醋酸镁、2 mmol/L $CaCl_2$、6 mmol/L 2-巯基乙醇，一起碾磨后将混合物以 28 000 *g* 在 2℃、pH 6.5 中离心 10 min。这样的 pH 环境能防止内源 mRNA 从多聚核糖体上释放下来，因而也就无须

预先温育以促使多聚核糖体形成[4,5]。上清液（S-28）通过用 20 mmol/L HEPES（pH 7.6）、120 mmol/L KCl、5 mmol/L 醋酸镁、6 mmol/L 2－巯基乙醇平衡的 Sephadex G-25（粗级）凝胶柱层析以除去内源氨基酸和对翻译有抑制作用的植物色素。反相层析可以防止氨基酸的损失。合并浓度高于 20 A_{260} nm/ml 的组分，然后以约 100 A_{260} nm/ml 的浓度分装。保存于－70℃，提取物可维持翻译活性一年以上。

2）[^{3}H] 或 [^{35}S] 标记的 L－氨基酸：为了检测翻译产物，在反应体系中加入 10～50 μCi放射性标记的（在翻译产物中含量丰富的）一种氨基酸。合适的比活是 [^{3}H] 标记氨基酸：140 Ci/mmol；[^{35}S] 标记氨基酸：1 Ci/mmol（参见注释 3）。放射性氨基酸应是水溶液，因为乙醇、盐、去污剂和某些溶剂都会干扰翻译。乙醇应通过冷冻干燥法除去；其他成分对翻译的影响都应事先分析确定。[^{35}S] 标记的氨基酸必须小量分装后置－70℃保存，这样可以稳定 6 个月；过此期限，其中的降解产物亚砜类物质会对翻译产生抑制作用。

3）信使 RNA：抽提总 RNA 和多聚腺苷酸化的 RNA 的方法已见诸许多报道[10～12]。方便的母液浓度为：总 RNA，1.5 mg/ml；或 polyA$^+$ RNA，150 μg/ml（在灭菌蒸馏水中）。RNA 在－70℃可稳定一年以上。钾离子（参见注释 1）、苯酚和乙醇污染必须分别通过 70%（v/v）乙醇洗涤、氯仿/丁醇（4∶1）抽提和冷冻干燥除去。

4）10×能量混合液：10 mmol/L ATP，200 μmol/L GTP，80 mmol/L 磷酸肌酸。应使用核苷三磷酸钾盐，并用 NaOH 调节 pH 值至 7.4～7.6。

5）0.5～1.0 mol/L 醋酸钾（参见注释 1），25 mmol/L 醋酸镁。

6）20 mmol/L DTT。

7）0.6～1.2 mmol/L 精胺或 4.0～8.0 mmol/L 亚精胺（参见注释 4）。

8）0.2 mol/L HEPES，pH 7.4～7.6（参见注释 5）。

9）200～500 μg/ml 肌酸激酶（参见注释 6）。

3. 方　　法

所有制备操作都应在冰上进行。各种组分用过后剩余部分用干冰快速冷冻。反应在灭菌塑料微型离心管中进行。

1）在一只反应管中混合下列溶液（总各量 50 μl）：5 μl 能量混合液，5 μl 醋酸钾/醋酸镁溶液，5 μl DTT，5 μl HEPES，5 μl 精胺，10 μl（0.3～8.0 μg）mRNA 水溶液（参见注释 7），10 μl 麦胚提取物，10 μl 肌酸激酶（0.8～1.0A_{260}U）和 5 μl 肌酸激酶。如果要同时进行多组反应，可按所需总量先制备前 5 种溶液的混合物，然后以每份 25 μl 分装到各组反应管中。肌酸激酶应最后加入以避免能量浪费。敲击或轻微振荡离心管以使溶液混匀。如果需要，可在肌酸激酶之前加入微粒体膜（0.5 A_{260}U）以检测翻译产物的加工作用（参见注释 8）[1)]。

1）原著该步骤有一些错误和疑问，因无法校正，逐句直译如文。很明显的有两点：第一，加了两次肌酸激酶是错文，由于总各量系 50 μl 所以似乎“10 μl 肌酸激酶（0.8～1.0 A_{260}U）”应删去；第二，没有加入放射性标记氨基酸，这与前后文均不一致。请读者综合参考本章的材料部分、注释 3 以及其他有关文献，然后自作结论。——译者注

2）于28℃保温1 h（参见注释9）。置4℃终止反应。

3）取一部分反应液进行TCA沉淀以检查放射性氨基酸掺入翻译产物的情况（参见第五十六章；注释10）。麦胚提取物系统中外源mRNA刺激的放射性氨基酸掺入翻译产物的效率一般没有网织红细胞裂解液系统那样高。

4）可用标准方法对剩余的体外翻译产物做进一步分析，例如胰蛋白酶定位和离子交换层析；对于专一性的产物，可先进行免疫沉淀，然后用SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析。

4．注　　释

（1）麦胚提取物的翻译活性对钾离子浓度的变化特别敏感。钾离子浓度低于70 mmol/L时，比较小的mRNA优先得到翻译；而较大mRNA的完全翻译则要求70 mmol/L或更高浓度的醋酸钾[2,5]。在适当的离子条件下，能合成大到200 kDa的多肽[9]。另外，氯离子对翻译有抑制作用，所以最好使用醋酸钾[5]。RNA制备物中残留的钾离子应通过70%乙醇洗涤彻底除尽。

（2）提取物固有的翻译活性随不同批号的麦胚材料而异。用以色列的一些面粉厂（例如"Bar-Rav" Mill，Tel Aviv）供应的麦胚制备的提取物通常都具有较高的翻译活性。

（3）绝大部分内源氨基酸已通过Sephadex G-25（粗级）凝胶层析除掉。根据所用麦胚提取物的不同，可能有必要加入氨基酸（终浓度25 μmol/L）和/或tRNA（终浓度58 μg/ml）以优化翻译活性。麦胚提取物对氨基酸饥饿特别敏感；使用比活高于所推荐的放射性氨基酸可能导致氨基酸饥饿从而抑制翻译。

（4）加入精胺或亚精胺通常能促进翻译，对于较大的多肽的合成尤为必需[5]，可能因为它们对较大的mRNA分子具有稳定作用。若省略任一成分，则须将醋酸镁的最适浓度提高到4.0～4.3 mmol/L。

（5）对麦胚提取物体外翻译系统来说，HEPES的缓冲效果比Tris-醋酸好[4]。如果使用后者，则钾离子和镁离子的最适浓度都须改变。

（6）肌酸激酶的各种商业制品在核酸酶污染程度上是有差别的，如果肌酸激酶的用量较大，必须考虑到这一点。

（7）较大的mRNA经70℃加热1 min然后在冰上快速冷却，这样可以提高它们在麦胚提取物系统中的翻译效率。

（8）伴同翻译的翻译产物加工过程可通过向翻译反应体系中加入狗胰腺微粒体膜来检测。这种膜可以用Jackson和Blobel介绍的方法[12]自行制备，也可与翻译试剂盒一起向厂商订购。微粒体膜应分装成约5 A_{260}nm U于20 mmol/L HEPES（pH 7.5）中，置－70℃保存，必须避免反复冻融。

（9）mRNA刺激的放射性氨基酸掺入翻译产物的过程是线性的：先有一个5 min的延滞期，接着是50 min的线性上升，90 min后全部完成。这一系统在高于30℃的温度中是不稳定的；最高活性随不同批号的麦胚提取物制品而异，一般在25～30℃之间。常用的反应温度是28℃。

（10）为了得到最高的翻译活性，须对每一次的麦胚提取物制品分别确定最佳反应条件，

包括 mRNA 浓度、钾离子和镁离子浓度以及反应温度等。还须考虑麦胚提取物柱层析洗脱液中各种盐的浓度。

参 考 文 献

1. Steward, A. G., Lloyd, M., and Arnstein, H. R. V. (1977) Maintenance of the ratio of α and β globin synthesis in rabbit reticulocytes. *Eur. J. Biochem.* **80,** 453–459.
2. Benveniste, K., Wilczek, J., Ruggieri, A., and Stern, R. (1976) Translation of collagen messenger RNA in a system derived from wheat germ. *Biochemistry* **15,** 830–835.
3. Huntner, A. R., Farrell, P. J., Jackson, R. J., and Hunt, T. (1977) The role of polyamines in cell-free protein in the wheat germ system. *Eur. J. Biochem.* **75,** 149–157.
4. Roberts, B. E. and Paterson, B. M. (1973) Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **70,** 2330–2334.
5. Davies, J. W., Aalbers, A. M. J., Stuik, E. J., and van Kammen, A. (1977) Translation of cowpea mosaic RNA in cell-free extract from wheat germ. *FEBS Lett.* **77,** 265–269.
6. Boedtker, H., Frischauf, A. M., and Lehrach, H. (1976) Isolation and translation of calvaria procollagen messenger ribonucleic acids. *Biochemistry* **15,** 4765–4770.
7. Patrinou-Georgoulas, M. and John, H. A. (1977) The genes and mRNA coding for the theory chains of chick embryonic skeletal myosin. *Cell* **12,** 491–499.
8. Larkins, B. A., Jones, R. A., and Tsai, C. Y. (1976) Isolation and in vitro translation of zein messenger ribonucleic acid. *Biochemistry* **15,** 5506–5511.
9. Schroder, J., Betz, B., and Hahlbrock, K. (1976) Light-induced enzyme synthesis in cell suspension cultures of *petroselinum. Eur. J. Biochem.* **67,** 527–541.
10. Pelham, H. R. B. and Jackson, R. J. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticuloctye lysates. *Eur. J. Biochem.* **67,** 247–256.
11. Darnbrough, C. H., Legon, S., Hunt, T., and Jackson, R. J. (1973) Initiation of protein synthesis: evidence for messenger RNA-independent binding of methionyl-transfer RNA to the 40S ribosomal subunit. *J. Mol. Biol.* **76,** 379–403.
12. Jackson, R. C. and Blobel, G. (1977) Post-translational cleavage of presecretory proteins with an extract of rough microsomes, from dog pancreas, with signal peptidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74,** 5598–5602.

第五十八章 应用 6×His 标签和 Ni-NTA 树脂对重组蛋白进行一步纯化

Joanne Crowe，Brigitte Steude Masone，Joachim Ribbe

1. 引 言

对于重组蛋白质和抗原性肽的亲和纯化，6×His/Ni-NTA 系统是一个快速而用途广泛的工具。其基本原理是利用连续的 6 个组氨酸残基（6×His 标签）与固定化镍离子的高度选择性的强亲和结合，来实现带有 6×His 标签的蛋白质或蛋白质复合体的一步纯化，使总蛋白样品中含量少到 1%以下的目标蛋白质在仅仅一步纯化中达到 95%以上的纯度[1,2]。由于标签与 Ni-NTA 树脂的结合非常牢固，所以可用严格的条件轻易地洗掉杂质；而目标蛋白质可通过咪唑的竞争或 pH 值的小幅度降低而被温和地洗脱。此外，这种相互作用不受标签的三级结构的影响，所以即使在溶解包涵体所需的强变性条件下也能进行带 6×His 标签蛋白质的纯化。

构成 6×His 标签的六个组氨酸残基可连接在重组蛋白的任一末端，在生理 pH 值条件下不带电荷，而且除某些猴以外对所有物种都基本没有免疫原性。因此，6×His 标签一般不会影响被贴标签的蛋白质的结构或功能，不必在纯化之后将它从蛋白质上去除掉[3]。另外，因为序列短小，很容易将它引入任何表达系统。

将 6×His/Ni-NTA 法与细菌高表达系统相结合，就得到了一个简单而又巧妙的蛋白质纯化方法——不论表达蛋白质的含量是高是低，是变性的或是与其他蛋白质、DNA 或 RNA 结合在一起，都行之有效。从抗体生产方面大规模蛋白质纯化到能与带标签蛋白质发生相互作用的抗体、亚基和底物的纯化，这一方法都得到广泛的应用。

1.1 用 pQE 系列表达载体表达蛋白质

pQE 系列的表达载体能在*E. coli* 中高水平地表达带有 6×His 标签的蛋白质或肽。标签可以位于蛋白质的 N 端，形成Ⅳ型结构；或者位于 C 端，形成Ⅲ型结构；或者位于一个从自身的 ATG 起始密码子开始翻译的蛋白质（pQE-60）的 C 端，形成 ATG 型结构（图 58.1）。如果要合成小肽，可以将它融合到鼠的二氢叶酸还原酶（dihydrofolate reductase，DHFR），形成Ⅱ型结构；其中免疫原性很低的 DHFR 能稳定正在表达中的小肽并增强其抗原性。

pQE 系列质粒来源于质粒 pDS56/RBSII 和 pDS781/RBSII-DHFRS[1]。如图 58.2 中的典型载体 pQE-30（IV 型）和 pQE-40（II 型）所示，它们含有下述结构要素：

①一个经优化的、可调控的启动子/操纵基因元件 N250PSN250P29。它含有来自 *E. coli* 噬菌体 T5 的启动子（能被*E. coli* RNA 聚合酶识别），该启动子含有两个

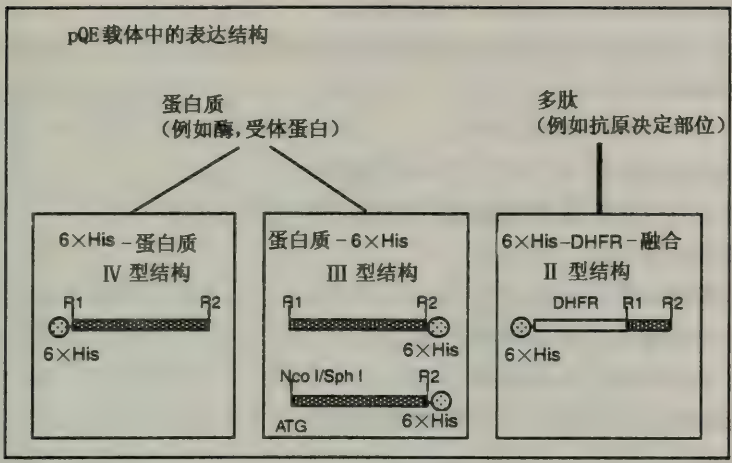


图 58.1　用 pQE 载体表达蛋白质的几种结构模式

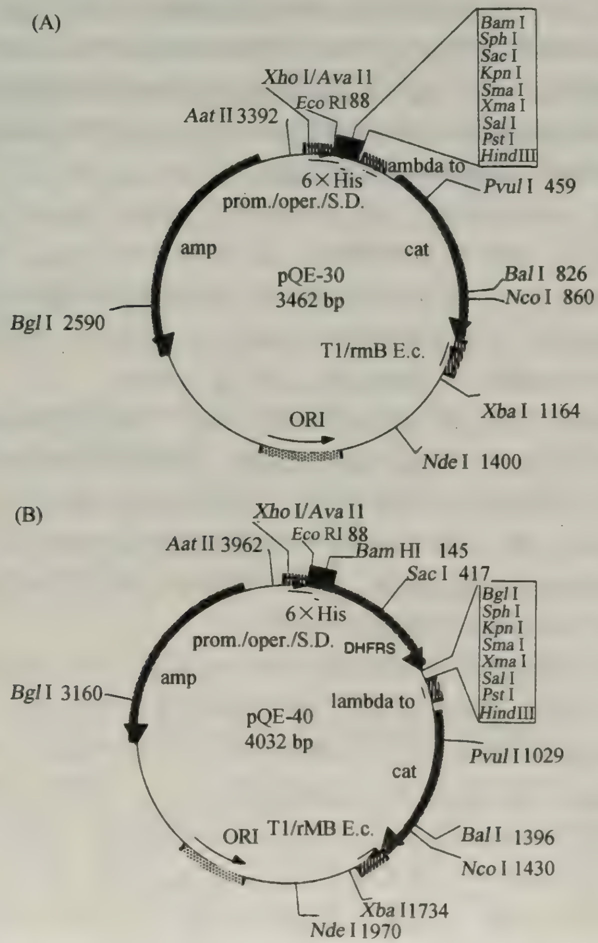


图 58.2　典型的 pQE 表达载体。(A) pQE-30 (Ⅳ 型结构)。多克隆位点区域紧接在 6×His 标签序列的 3′端。(B) pQE-40 (Ⅱ 型结构)。在 6×His 标签和多克隆位点区域之间有一 DHFRS 序列。DHFRS 对短小的蛋白链有稳定作用。

lac 操纵基因序列，可确保严格的调控；

②一个人工合成的、极易被识别和结合的核糖体结合位点（ribosome binding site Ⅱ，RBSⅡ）；

③优化的 6×His 标签编码序列；

④小鼠 DHFR 编码序列（仅见于某些载体）；

⑤多克隆位点（可形成各种读框）；

⑥所有读框的翻译终止密码子；

⑦来自 λ 噬菌体的转录终止子“t_0”；

⑧不翻译的氯霉素乙酰转移酶开放读框；

⑨*E.coli rrn*B 操纵子的转录终止子“t_1”；

⑩质粒 pBR322 的复制区及 β-内酰胺酶基因。

E.coli 宿主细胞 M15［pREP4］和 SG13009［pREP4］含有多拷贝的 pREP4 质粒。该质粒带有能使宿主产生卡那霉素抗性的新霉素磷酸转移酶（NEO）基因和编码 *lac* 阻遏物的 *lac*I 基因。多拷贝的 pREP4 使宿主细胞含有高水平的 *lac* 阻遏物，从而保证对蛋白质表达的严格调控。含 25 μg/ml 卡那霉素的培养基能维持该质粒在 *E.coli* 细胞中的存在[1]。加入使阻遏物失活的 IPTG 可快速诱导 pQE 载体上基因的表达。通过改变诱导物 IPTG 的用量可以控制表达水平的高低。

带有阻遏质粒（pREP4）的 *E.coli* 菌株 M15［pREP4］或 SG13009［pREP4］很适于用来表达重组蛋白。带有 *lac*I^q 基因的 *E.coli* 菌株如 XL1-Blue、JM109 和 TG1 等可用来保存和增殖 pQE 质粒，因为它们无须携带 pREP4 质粒就能产生足够的 *lac* 阻遏物以阻止有关基因的表达。它们也能用做表达型宿主，但其表达过程不像带 pREP4 质粒的菌株那样能被严格地调控，可能会出现“毒”蛋白问题。

用 Ni-NTA 树脂进行纯化所需的亲和标签仅由六个连续的组氨酸残基组成。这意味着只向重组蛋白质上引入很少的几个额外氨基酸。该标签只有很弱的免疫原性，而且对除某些猴以外的所有物种根本没有免疫原性，且在生理 pH 值条件下不带电荷，一般不影响蛋白质的分泌或折叠。在数百种用这一系统纯化的蛋白质中几乎没有发现 6×His 标签干扰蛋白质的结构或功能的现象。若干种带有 6×His 标签的蛋白质已被结晶，它们的结构与未加标签的同种蛋白质没有不同[4]。

因为一般没有必要在蛋白质纯化后除去 6×His 标签，所以 pQE 载体不包含有关的蛋白酶切割位点；相反，在很多情况下，标签的存在是大有好处的——经纯化后仍带着 6×His 标签且未丧失功能的蛋白质可以被固定在 Ni-NTA 树脂上以便进行许多下游工作，如抗体的纯化以及蛋白质相互作用的研究等[5~7]。大多数蛋白酶的切割位点由带电荷很强的氨基酸残基组成，如果重组蛋白上带有这种位点，可能会给下游应用带来问题，所以通常必须将它切除（可能既费时又低效）。当然，如果有必要在纯化后将 6×His标签从蛋白质上切除，可以在克隆过程中引进一个合适的蛋白酶作用位点。蛋白酶 rTEV（Life Technologies，Gaithersburg，MD）带有一个 6×His 标签，很容易用 Ni-NTA 柱将它与被切割的蛋白质（以及 6×His 标签片段和所有未被切开的蛋白质分子）一道被分离开来[8]

因为序列短小，6×His 标签也能方便地被引入各种各样的其他表达系统。在原核类、哺乳类、酵母、杆状病毒以及其他真核系统中，6×His 标签都能很好地发挥作用。六个组氨酸残基能很容易地通过 PCR、诱变或人工合成小片段的连接而被引进表达结构中，位于表达产物蛋白质的 C 端或 N 端。

1.2 用 Ni-NTA 树脂纯化所表达的蛋白质

固定化金属螯合物亲和层析法于 1975 年首次被用来进行蛋白质纯化[9]。因为简便而有效，这种技术现已得到非常广泛的应用。在开发利用氮-三乙酸（nitrilo-triacetic acid，NTA）之前，人们用配位体亚氨基二乙酸（iminodiacetic acid，IDA）与金属离子如 Zn^{2+} 或 Ni^{2+} 形成的螯合物去纯化各种各样的蛋白质和多肽[10]。但 IDA 只有三个螯合基团，不能牢固地螯住这些具有六个配位位置的金属离子。因而当用具有温和螯合作用的蛋白质或多肽上柱时，或在洗脱待纯化蛋白质的过程中，金属离子都有可能从树脂上被冲洗下来，从而导致低结合容量、低收率以及产物的不纯。

NTA 正是为了解决上述问题而被开发应用的一种新颖的螯合剂（图 58.3）。NTA 能与 Ni^{2+} 形成四个配位键（剩下的两个位点可自由地与 6×His 标签相互作用），因而能更牢固地螯住金属离子[11]。因此 Ni-NTA 树脂与蛋白质的结合比 Ni-IDA 要稳定约 100～1000 倍；使它可以将含量占细胞总蛋白 1%以下的蛋白质一步纯化到 95%以上的纯度[2]。

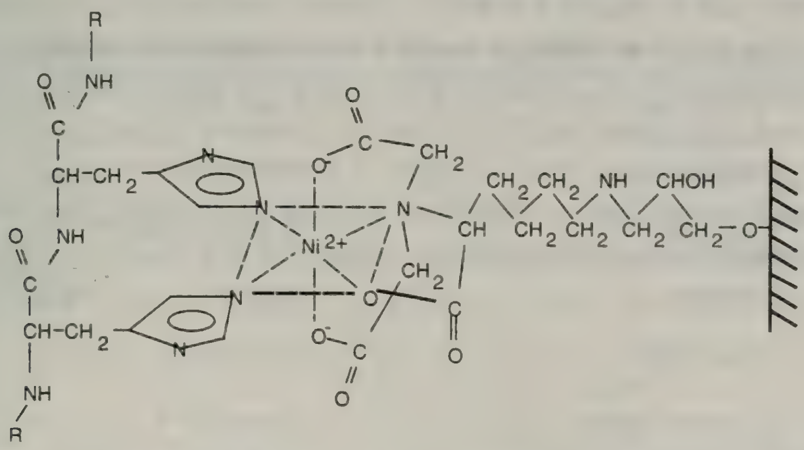


图 58.3 相邻的 His 残基与 Ni-NTA 树脂相结合的模型。

NTA 配基以很高的表面浓度附着到支持体如 Sepharose CL-6B（NTA 琼脂糖）或硅胶上即得到 Ni-NTA 树脂。Ni-NTA 与琼脂糖的结合容量为每毫升树脂 5～10 mg 带标签蛋白质（即 1 ml Ni-NTA 琼脂糖通常能结合 300～400 nmol 蛋白质）——取决于蛋白质的大小、特性和纯化条件。Ni-NTA 琼脂糖非常稳定且易操作，可于室温保存。将 Ni-NTA 与硅胶相连而制成的适当规格的 Ni-NTA 离心柱可用于蛋白质小量制备。每个离心柱能从细胞裂解液中纯化出多达 100 μg 的带 6×His 标签的蛋白质，整个过程只需

15 min 即可完成。小量制备蛋白质是对表达与纯化条件的快速优化，对低水平表达的蛋白质的浓缩以利于进行凝胶电泳分析以及对各种人工表达结构进行功能筛选的理想途径。

在 N 端或 C 端带有 6×His 标签的蛋白质与 Ni-NTA 树脂之间的亲和力比大多数抗体和抗原、酶和底物之间的亲和力强得多。所以，能很容易地在比较严格的条件下洗除因天然含有相邻组氨酸残基而结合到树脂上的杂质蛋白，而不影响带标签的蛋白质与树脂的结合。这种高结合常数使那些在样品溶液中含量非常稀少的蛋白质，如表达水平很低或分泌到培养基中的蛋白质，也能有效地与树脂结合并被纯化。

带标签的蛋白质与树脂的结合不要求蛋白质具有任何功能性的结构，因而不受强变性剂如 6 mol/L 盐酸胍（GuHCl）或 8 mol/L 尿素的影响。这意味着与那些基于抗原/抗体或酶/底物相互作用的纯化系统不同，Ni-NTA 可用来纯化几乎所有的蛋白质，甚至那些在自然（非变性）条件下不可溶解因而须在纯化之前进行变性处理的蛋白质(如疏水性蛋白质和其他形成包涵体的蛋白质)。此外，在上柱缓冲液中加入少量的 β-巯基乙醇，能轻易地排除那些因形成二硫键而可能被一起纯化的 *E. coli* 宿主的蛋白质。

低浓度的去污剂，如 Triton X-100 和 Tween-20，或高浓度的盐（表 58.1）也不会影响带标签的蛋白质与树脂的结合，因此可以彻底清除那些因非特异性疏水作用或离子间相互作用而在正常条件下可能会被一起纯化的蛋白质。与某些 DNA 或 RNA 结合蛋白连在一起的核酸也能被有效地清除而不影响带标签的蛋白质的回收。

表 58.1　一般不会影响 6×His 标签与 Ni-NTA 树脂相结合的一些试剂

6 mol/L GuHCl	8 mol/L 尿素
2% Triton® X-100	2% Tween-20
1% CHAPS	20 mmol/L β-巯基乙醇
50% 甘油	30% 乙醇
2 mol/L NaCl	5 mmol/L $CaCl_2$
25 mmol/L Tris-HCl	20 mmol/L 咪唑

有几种方法可用于带标签的蛋白质的洗脱。降低 pH 值能使组氨酸残基质子化从而与 Ni-NTA 配基解离。单体蛋白质一般可于 pH 5.9 左右洗脱，而聚集体和带有一个以上标签的蛋白质能于 pH 4.5 左右洗脱。通过咪唑的竞争结合也能将带标签的蛋白质从 Ni-NTA 上置换下来而得以洗脱。还可以用低浓度的咪唑选择性地洗除与树脂结合得不很牢固的杂质，或者在过柱时阻止杂质与树脂的结合[2]。Ni-NTA 纯化的一个典型结果见图 58.4。

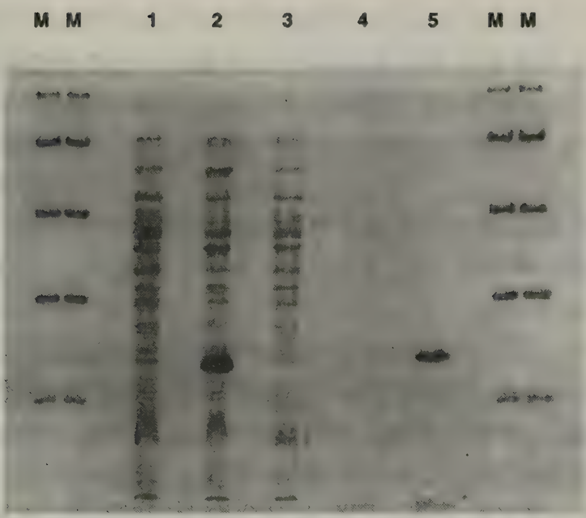


图 58.4 从细菌中纯化 DHFR（采用变性条件）。泳道 1：未经诱导的细胞的总蛋白；泳道 2：经诱导的细胞的总蛋白；泳道 3：过柱流出液，pH 8.0；泳道 4：洗脱组分，pH 6.3；泳道 5：纯化的洗脱蛋白质，pH 5.9；泳道 M：相对分子质量标准。

1.3 一般注意事项

本章介绍一种小量制备蛋白质的技术，它可被用来检验蛋白质是否已得到正确的表达，并检验在非变性条件和变性条件下从 *E. coli* 中大量纯化蛋白质的方法。虽然每种方法对于大多数蛋白质都是非常有效的，但若使用除 *E. coli* 以外的其他表达宿主，则可能须对这些方法做些必要的修改。对各种不同的蛋白质分别优化反应条件，方能更好地发挥 6×His/Ni-NTA 系统的纯化能力。注释 1～5 考虑了一些可能的修改方案。

在变性条件下纯化的蛋白质能直接用于抗体诱导，经透析处理后能在溶液中重新折叠；也可以使之在 Ni-NTA 柱上重新折叠，然后洗脱或者作为固定化配基供进一步研究之用（参见注释 1）。

2. 材　　料

各种 pQE 载体，*E. coli* 宿主 M15［pREP4］和 SG13009［pREP4］，Ni-NTA -琼脂糖以及 Ni-NTA 离心柱都由 Qiagen 供应，包括 Qiagen GmbH（Hilden，Germany），Qiagen Inc.（Chatsworth，CA），Qiagen Ltd.（Dorking，UK），Qiagen AG（Basel，Switzerland）以及它们的分部。

2.1 小量表达培养物的快速筛查

1）培养基：含 100 μg/ml 氨苄青霉素和 25 μg/ml 卡那霉素的 LB 液体培养基或 2× YT 或高浓度培养基，用于培养带 pQE 表达系统和 pREP4 阻遏质粒的 M15 细胞（参见

注释 6)。

LB：每升含 10 g 细菌培养用胰蛋白胨、5 g 细菌培养用酵母提取物和5 g NaCl。

2×YT：每升含 16 g 细菌培养用胰蛋白胨、10 g 细菌培养用酵母提取物和5 g NaCl。

高浓度培养基：每升含 25 g 细菌培养用胰蛋白胨、15 g 细菌培养用酵母提取物和 5 g NaCl。

2) IPTG：母液浓度 1 mol/L。
3) 缓冲液 A：6 mol/L 盐酸胍（GuHCl），0.1 mol/L NaH_2PO_4，0.01 mol/L Tris-HCl，用 NaOH 调 pH 值至 8.0。
4) 缓冲液 B：8 mol/L 尿素，0.1 mol/L NaH_2PO_4，0.01 mol/L Tris-HCl，用 NaOH 调 pH 值至 8.0。为避免尿素解离的影响，pH 值应在临用前调节。
5) 缓冲液 C：成分与缓冲液 B 相同，但用 HCl 调 pH 值至 6.3。为避免尿素解离的影响，pH 值应在临用前调节。
6) 缓冲液 E：成分与缓冲液 B 相同，但用 HCl 调 pH 值至 4.5。为避免尿素解离的影响，pH 值应在临用前调节。
7) 5×SDS-PAGE 加样缓冲液：15% β-巯基乙醇，15% SDS，1.5%溴酚蓝和 50%甘油。
8) 12.5%聚丙烯酰胺凝胶，含 0.2% SDS[12]。

2.2 非变性条件下可溶性蛋白质的纯化

9) 超声处理缓冲液：50 mmol/L NaH_2PO_4，300 mmol/L NaCl，10 mmol/L 咪唑和 1 mmol/L PMSF。
10) 溶菌酶：10 mg/ml 贮存液。
11) RNase：200 mg/ml 贮存液。
12) DNase：60 mg/ml 贮存液。
13) 洗涤缓冲液：50 mmol/L NaH_2PO_4，300 mmol/L NaCl，20 mmol/L 咪唑和 1 mmol/L苯甲基磺酰氟（phenylmethyl sulfonyl fluoride，PMSF)。
14) 洗脱缓冲液：50 mmol/L NaH_2PO_4，300 mmol/L NaCl 和 250 mmol/L 咪唑。

2.3 变性条件下不溶性蛋白质的纯化

15) 缓冲液 D：成分与缓冲液 B 相同，但用 HCl 调 pH 值至 5.9。为避免尿素解离的影响，pH 值应在临用前调节。

3. 方　　法

3.1 小量表达培养物的快速筛查

下面介绍的是一种在小量培养物中表达蛋白质并通过用 Ni-NTA 离心柱纯化带

6×His标签的蛋白质，以便对表达结果进行筛查的基本方法。纯化工作在变性条件下进行，因此任何带标签的蛋白质，不论它在细胞内的溶解度如何，都能被分离出来。此外，带6×His标签的蛋白质经变性后其6×His标签完全暴露在外，从而更容易与Ni-NTA结合，与非变性条件下的纯化相比，产率也因此得到提高（参见注释1）。

用缓冲液B裂解细胞可以使大多数蛋白质和包涵体溶解，因此可直接用SDS-PAGE对裂解液进行分析。然而，如果细胞或蛋白质不能在缓冲液B中溶解（例如高度疏水性蛋白质和一些膜蛋白），就必须采用缓冲液A。GuHCl是一种比尿素更有效的溶解剂，可能为溶解包涵体所必需。此外还可能有必要加入非离子型去污剂（在SDS-PAGE之前须对缓冲液A裂解样品进行处理，方法见注释7）。

如果蛋白质的表达水平很高（>10 mg/L，约占细胞总蛋白的8%），则裂解液的浓缩程度[1)]不应超过25倍；若表达水平较低（2～5 mg/L），裂解液浓缩可高达50倍。当表达水平低于1 mg/L时，裂解液须经浓缩至少50倍，以保证能通过考马斯兰染色检测蛋白质的存在（见表58.2和注释8）。

表58.2 用Ni-NTA离心柱纯化蛋白质时所用细胞培养物的合适体积的一些例子[a]

带标签蛋白质/（mg/L）	表达水平/%	培养物体积/ml	600 μl裂解液中带标签的蛋白质的含量/μg	浓缩倍数
变性条件				
50	40	3	90	3×
10	8	10	60	10×
2	1.6	25	30	25×
0.5	0.4	50	15	50×
0.1	0.08	100	6	100×
非变性条件				
>1	>1	50	>30	50×
<1	<1	100	<60	100×

a 以预期的表达水平和特定的纯化条件下制备1 ml细胞裂解液为依据。

有些蛋白质可能在细胞的收获、裂解甚至诱导后的生长期间发生降解。在这种情况下，最好加入PMSF（0.1～1 mmol/L）或其他蛋白酶抑制剂。不过在细胞生长期间用PMSF处理可能会导致表达水平的降低。所有培养基都应含100 μg/ml氨苄青霉素和25 μg/ml卡那霉素。

1）将一个新鲜的带pQE表达质粒的M15［pREP4］菌落接种到10 ml含100 μg/ml氨苄青霉素和25 μg/ml卡那霉素的LB培养液中，37℃培养过夜。

2）将200 μl未经诱导的过夜培养物稀释到10 ml含100 μg/ml氨苄青霉素和25 μg /ml卡那霉素的新鲜LB培养液中（1∶50稀释）。37℃剧烈振荡培养至A_{600}值达到0.7～0.9（参见注释8和表2）。

1）指诱导培养物体积对裂解液体积的比值，下同。——译者注

3）加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L，然后于 37℃ 继续培养 4 h（参见注释 9）。

4）培养物于 4 000 *g* 离心 10 min，弃上清液，收获细胞。

5）用 0.1 倍体积[1]的缓冲液 B 悬浮细胞。轻微涡旋振荡，或者于室温搅拌 1 h 使细胞裂解。注意避免泡沫（参见注释 10）。

6）裂解物以 10 000 *g* 室温离心 10 min 以除去细胞碎片。将上清液转移到一只新管中。保留沉淀物和 20 μl 裂解液供 SDS-PAGE 分析（参见注释 11）。

7）用 600 μl 缓冲液 B 预先平衡 Ni-NTA 离心柱。以≤700 *g*（约 2000 r/min）离心2 min（参见注释 12）。

8）将多达 600 μl 含带 6×His 标签的蛋白质的裂解液上清液加到经预平衡过的 Ni-NTA 离心柱上。以≤700 *g* 离心 2 min（参见注释 13）。保留过柱流出液以供 SDS-PAGE 分析。

9）用 2×600 μl 缓冲液 C 洗涤 Ni-NTA 离心柱。以≤700 *g* 离心 2 min。保留过柱流出液以供 SDS-PAGE 分析（参见注释 14）。

10）用 2×200 μl 缓冲液 E 洗脱蛋白质。以 2000 r/min 离心 2 min，分管收集两次洗脱物（参见注释 15）。

11）从所有各种组分中分别取出 20 μl 样品，各加 5 μl 5×PAGE 加样缓冲液（参见注释 7），于 95℃ 加热 7 min。通过 12.5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳及考马斯蓝染色分析样品。

3.2 在非变性条件下可溶性蛋白质的大量纯化

这一方法利用 Ni-NTA 琼脂糖纯化多达 5～10 mg 的可溶性带 6×His 标签的蛋白质。在用非变性条件纯化蛋白质之前，重要的是应该先弄清目标蛋白质有多少溶解在细胞质中，有多少存在于不可溶的沉淀物或包涵体中。因此，最好在变性条件下同时对蛋白质进行纯化（第 3.3 节）。

待纯化蛋白质的量取决于它的表达水平。这一方法适用于表达水平在 1～5 mg/L 间的情况。为了得到最好的结果，应根据带 6×His 标签的蛋白质的表达水平对此法加以适当的放大或缩小。在过柱、洗涤和洗脱的过程中液流速度都不应超过 1 ml/min。

1）按第 3.1 节所列的方法培养和诱导 1 L 培养物。

2）于 4000 *g* 离心 20 min 收获细胞。用 2～5 体积/g 湿重[2]的超声处理缓冲液重新悬浮沉淀物（参见注释 16）。在干冰/乙醇中冷冻（或置 −20℃ 过夜），然后于冷水中融化；或者加入溶菌酶至 1 mg/ml，置冰上 30 min。

3）在冰上进行超声处理（1 min 处理/1 min 冷却/200～300 W），并通过测定 A_{260} 吸收值检查核酸释放程度以监测细胞破裂情况，直至 A_{260} 吸收达到最大值。

4）如果裂解液非常黏稠，可加入 RNase A 至 10 μg/ml 和 DNase I 至 5 μg/ml，冰浴 10～15 min；或者使裂解液反复几次通过小孔径注射针。然后以 >10 000 *g* 4℃ 中离心 20 min 以收集上清液。保留 20 μl 上清液以供 SDS-PAGE 分析。

1）诱导培养物体积的 1/10，这里为 1 ml，浓缩倍数为 10 倍。——译者注

2）此种表示方式很不明确，似应作"2～5 ml/g 湿重"。——译者注

5）加入 2 ml 预先在超声处理缓冲液中平衡过的 50%Ni-NTA 琼脂糖匀浆，在冰上搅拌 60 min（参见注释 17）。
6）将上述裂解液和 Ni-NTA 琼脂糖的混合物装柱，收集过柱流出液供 SDS-PAGE 分析。尽可能于 4℃操作。
7）用 8 ml 超声处理缓冲液洗涤，或直到流出液的 A_{280}吸收值低于 0.01（参见注释 18）。收集各洗涤组分供 SDS-PAGE 分析。
8）用 2×8 ml 洗涤缓冲液洗涤，或直到流出液的 A_{280}吸收值低于 0.01。
9）用 6 ml 洗脱缓冲液洗脱蛋白质（参见注释 19）。按 500 μl/管收集洗脱组分，各取 5 μl 样品进行 SDS-PAGE 分析（参见注释 7、20 和 21）。

3.3　在变性条件下不溶性蛋白质的大量纯化

这一方法利用 Ni-NTA 琼脂糖纯化多达 5～10 mg 的带 6×His 标签的蛋白质。用变性条件纯化蛋白质通常比用非变性条件较为有效，对那些不经变性就无法溶解的蛋白质来说更属必要。

待纯化蛋白质的量取决于它的表达水平。这一方法适用于表达水平大约为 10 mg/L 的情况。为了得到最好的结果，应根据带 6×His 标签的蛋白质的表达水平对此法加以适当的放大或缩小。在过柱、洗涤和洗脱的过程中液流速度都不应超过 1 ml/min。

1）按第 3.1 节给出的方法培养和诱导 500 ml 培养物。以 4 000 *g* 离心 10 min 收获细胞。可置 -70℃保存。
2）将细胞融化 15 min，然后用 5 ml/g（湿重）的缓冲液 B 重新悬浮（参见注释 10 和 22）。在室温中搅拌 1 h。以 10 000 *g* 在室温将裂解物离心 15 min。收集上清液并留出 20 μl 供 SDS -PAGE 分析（参见注释 18）。
3）加入 2 ml 预先在缓冲液 B 中平衡过的 50%Ni-NTA 琼脂糖匀浆。室温搅拌 45 min，然后小心装柱。收集过柱流出液供 SDS-PAGE 分析。
4）用 10 ml 缓冲液 B 洗涤。若有必要，则进一步洗涤直到流出液的 A_{280}吸收值低于 0.01。
5）用 6 ml 缓冲液 C 洗涤，或直到流出液的 A_{280}吸收值低于 0.01。
6）用 10 ml 缓冲液 E 洗脱蛋白质（参见注释 23）。按 500 μl/管收集洗脱组分，用 SDS-PAGE 分析样品（参见注释 7、20 和 21）。

在纯化过程中可能会遇到的问题及其解决方法见注释 23～28。

4. 注　　释

(1) 很多蛋白质在表达过程中一直处于溶解状态，在非变性条件下能以天然形式在 Ni-NTA 柱上得到纯化，有些蛋白质在表达后会形成不溶性沉淀。但几乎所有的这些蛋白质都能在 6 mol/L 盐酸胍中溶解。因此，6×His 标签/Ni-NTA 系统可用于所有重组蛋白质的纯化。纯化时采用变性条件还是非变性条件，取决于目标蛋白质的溶

解度和它所处的位置以及与 6×His 标签的接触程度。对表达后溶解在细胞质中或分泌到外周质间隙中的蛋白质，一般可用非变性条件进行纯化（但请注意后面提到的例外）。如果目标蛋白质是不溶性的或存在于包涵体中，一般须在纯化前进行变性处理使它溶解。不过加入去污剂有时也能使某些蛋白质溶解；所以如果有必要保持蛋白质的天然构型，则值得尝试各种不同的促溶技术。很多形成包涵体的蛋白质往往在细胞质中也存在着一定的量，因而也能有效地在 Ni-NTA 柱上以天然状态被纯化，即使得率非常低。

在某些罕见的情况下，6×His 标签被处于天然状态下的蛋白质的三级结构隐藏起来。这时，可溶性蛋白质也须经变性才能结合到 Ni-NTA 树脂上。如果不希望进行变性处理，将 6×His 标签移到蛋白质的另一末端通常也能解决问题。用变性条件纯化的蛋白质或者可直接投入应用，或者在有还原型及氧化型谷胱甘肽存在的情况下，在稀的溶液中经透析除掉变性剂而使它重新折叠[13,14]。此外，还有可能使蛋白质在 Ni-NTA 柱上发生复性[2,15,16]。

（2）利用 Ni-NTA 树脂可以大批量纯化蛋白质，也可以在离心柱上进行小量纯化。批量纯化工艺要求在溶液中进行目标蛋白质和 Ni-NTA 树脂的结合，然后小心倒掉上清液并将蛋白质/树脂复合体装柱以便进行洗涤和洗脱。这样做能使蛋白质以更高的效率与树脂结合，尤其是在非变性条件下，而且可以减少加到柱上的细胞碎片的量。在小量的柱纯化法中，将细胞裂解液慢慢加到装好并经过平衡的 Ni-NTA 离心柱上。

（3）背景污染来自序列中含有毗邻组氨酸因而与树脂有一定亲和力的蛋白质，来自以二硫键与带 6×His 标签的蛋白质相连而被连带纯化的蛋白质，来自通过非特异性相互作用与带标签的蛋白质相连的蛋白质以及与带标签的蛋白质结合在一起的核酸等。用适当的条件洗涤树脂，可以轻易地排除所有这些污染物。一级结构中含有毗邻组氨酸的蛋白质在细菌中并不多见，但在哺乳类细胞中却屡见不鲜。这些蛋白质与树脂的结合比带 6×His 标签的蛋白质要弱得多，因而即使其含量远比后者高，也很容易被洗除[2]（另请参考注释 4）。在上柱缓冲液中加入 10～20 mmol/L 的 β-巯基乙醇可以减少由交联蛋白质引起的污染。不要使用＞1 mmol/L 的 DTT，因为高浓度的 DTT 可能还原 Ni^{2+} 离子。

因非特异性相互作用而与带标签的蛋白质或树脂相连的蛋白质以及伴同纯化的核酸都可以通过以下几种方法清除：用低浓度的去污剂（≤2% Triton X-100 或 0.5% 十二烷基肌氨酸钠）洗涤；增加盐浓度直至 2 mol/L NaCl；或者加入 30% 乙醇或 50% 甘油以减弱疏水性相互作用。对不同的蛋白质应通过实验确定上述各种试剂的最佳浓度。

（4）污染蛋白质的洗除和带标签的蛋白质的洗脱可以通过降低 pH 值使组氨酸残基质子化，或加入与带标签的蛋白质竞争 Ni-NTA 树脂结合位点的咪唑来实现。虽然两种方法同样有效，但第二种方法相对来说比较温和；当降低 pH 值可能会损害蛋白质（例如四聚体醛缩酶）时，最好采用咪唑竞争法[3]。

当使用细菌表达系统时，一般没有必要用非常严格的条件去洗涤结合的蛋白质，因为蛋白质的表达水平很高而背景污染较少。不过对哺乳类系统，或者当在非

变性条件下会有很多的毗邻组氨酸残基暴露在外而易与树脂结合时，可能就有必要显著地提高洗涤的严格程度。这可通过逐渐降低洗涤缓冲液的 pH 值或缓慢提高咪唑的浓度来实现。在洗脱开始前不同的蛋白质所能容忍的 pH 值和咪唑浓度也略有不同。

当带标签的蛋白质含量非常低而背景一般较高的情况下（如在哺乳类表达系统中），最好在稍低的 pH 值或有低浓度咪唑存在的条件下使带 6×His 标签的蛋白质与树脂结合，在这样的环境中，背景蛋白质无法竞争结合位点。同样道理，如果带标签的蛋白质的量与所用树脂的结合容量配合得恰到好处，换句话说在尽量减少树脂的用量的情况下，也能得到最好的纯化效果（H. Stunnenberg，私人通讯）。因为带 6×His 标签的蛋白质与 Ni-NTA 树脂的亲和力较背景蛋白质为高，它会占据所有可能结合的位点而使只有极少量的背景蛋白质能在树脂上存留。

(5) 不要在树脂上使用强还原剂如 DTT 或 DTE，因为它们会还原 Ni^{2+} 离子而使它从树脂上洗脱下来。在大多数情况下，可以使用高至 20 mmol/L 的 β-巯基乙醇，但如果蛋白质本身也具有强还原性，即使这样低的浓度也偶尔会带来问题。应小心使用任何还原性物质，要是拿不准，可以先在小量 Ni-NTA 树脂上检测它们的效应。强螯合剂也会从 NTA 树脂上夺走 Ni，因此不要使用 EDTA、EGTA 或任何其他螯合剂。（不过也有一些在缓冲液中使用 1 mmol/L EDTA 的成功的例子。）

(6) 我们建议同时使用所有三种培养基来试行表达，并在加诱导物后记录表达的时间进程。在不同的培养基中表达不同的时间，表达水平往往有显著的差别。

(7) 在微型凝胶上，每一组分取样 5 μl 加等体积的、含或不含 3%β-巯基乙醇的 SDS-PAGE 加样缓冲液进行分析一般就足够了。含 GuHCl 的组分会与 SDS 发生沉淀，所以在电泳前必须对它们先行稀释（1:6）后透析处理；或者通过 TCA 沉淀使它与 GuHCl 分离。方法是：将样品稀释到 100 μl，加等体积 10% 的 TCA，置冰上 20 min，离心 15 min，用 100 μl 冰镇乙醇洗涤沉淀，干燥后用加样缓冲液溶解。如果样品中存在哪怕极微量的 GuHCl，也应在 95℃ 中煮 7 min 后立即上样。

(8) 表达培养物所需的体积主要取决于表达水平及表达产物在细胞中的位置和纯化条件。纯化低水平表达的蛋白质至少需要 30 ml 细胞培养物。加到 Ni-NTA 离心柱上的细胞裂解液应经 50 倍浓缩以增加带 6×His 标签的蛋白质的含量和溶液的黏度从而提高得率。纯化高水平表达的蛋白质，尤其是使用变性条件时情况有所不同（见表 58.2）。对于很高水平表达的蛋白质（>10 mg/L，相当于表达产物约占细胞总蛋白的 8%），制备细胞裂解液时的浓缩倍数不应超过 10 倍[1]。当表达水平为 10 mg/L 时，在用缓冲液 B 制备的、经 10 倍浓缩的 600 μl 细胞裂解液中大约含有 60 μg 带6×His 标签的蛋白质。对于以较低水平表达的蛋白质（2～5 mg/L），细胞裂解液应经 25 倍浓缩（600 μl 裂解液中含 30～75 μg 蛋白质）后加到 Ni-NTA 离心柱上。若表达水平低于 1 mg/L，细胞裂解液应经 50～100 倍浓缩。

(9) 如果表达产物很容易降解，则应缩短诱导培养过程并确定最佳表达时间。在某些情况下，可在诱导后加入 0.1～1 mmol/L PMSF 以抑制对 PMSF 敏感的蛋白酶。不

1）这一句与第 3.1 节中有关的说法不一致。——译者注

过 PMSF 处理会导致表达水平的降低。

(10)完全裂解后溶液应变成半透明状。用缓冲液 B 裂解细胞比较好，这样，细胞裂解液可以直接用于 SDS-PAGE 分析。如果细胞或蛋白质在缓冲液 B 中不能溶解，则须采用缓冲液 A。在 SDS-PAGE 上样前用缓冲液 A 处理样品的方法见注释 7。

(11)所有可溶性蛋白质都在上清液中。不溶性蛋白质则形成沉淀。应保留沉淀物并用 SDS-PAGE 进行分析。

(12)将 Ni-NTA 离心柱离心时，转速不要超过 2000 r/min（约 700 *g*），这一点很重要。更高的转速会使 NTA 硅胶颗粒被压紧，导致高流速（沟流）以及结合效率降低。

(13)当结合过程以较低的动力学水平进行时，例如在非变性条件下，建议将过柱流出液再次上柱。

(14)即使开始时采用缓冲液 A 溶解蛋白质，仍用缓冲液 C 洗涤 Ni-NTA 离心柱。大多数蛋白质可在缓冲液 C 中保持溶解状态，有时可能没有必要重复缓冲液 C 洗涤步骤。为获得高度纯净的蛋白质所需的洗涤次数主要取决于带 6×His 标签的蛋白质的表达水平。表达水平较高时，两次洗涤通常就足以排除污染。如果表达水平很低，或裂解液浓缩程度很高，则可能需要三次洗涤以保证高纯度。

(15)大部分带 6×His 标签的蛋白质（>80%）会被洗脱到最初的 200 μl 洗脱液中，特别是在待纯化蛋白质的分子质量小于 30 kDa 时。剩下部分会被洗脱到第二个 200 μl 洗脱液中。如果不希望得到低浓度的蛋白质溶液，就不要合并洗脱液，或者按每管 100～150 μl 收集洗脱物以提高蛋白质的浓度。

(16)超声处理、洗涤及洗脱缓冲液的成分可加修改以适应特殊用途，例如，在加入低浓度的咪唑、1%～2% Tween、5～10 mmol/L β-巯基乙醇、1 mmol/L PMSF 或者提高 NaCl 或甘油的浓度的情况下。

(17)如果在这些条件下带 6×His 标签的蛋白质不能与树脂结合，则应将超声处理缓冲液中咪唑的浓度减少到 1～5 mmol/L。参考注释 1 中有关“隐藏”标签的叙述。

(18)变色的或不纯净的试剂会影响光密度读数，咪唑在 280 nm 处也有光吸收。

(19)有多种不同的方法可用来洗脱蛋白质。如果合适或愿意，可通过调节 pH 值从 8.0 下降到 4.5 来洗脱，pH 值可以连续地或逐级下降。大多数蛋白质能用 pH 4.5 的缓冲液有效地洗脱，虽然有许多（特别是单体蛋白质）可以在更高的 pH 值下洗脱。

(20)如果可能，在洗脱过程中随时测定洗脱物的 A_{280}值，把几管的量合在一起收集而不必逐管收集。

(21)在 SDS-PAGE 之前不要煮沸处理含有咪唑的样品，否则会使对酸不稳定的键发生水解。可将样品于 37℃ 加热几分钟，然后立即上样。

(22)纯化过程于 8 mol/L 尿素中进行，因为 6 mol/L 盐酸胍会与 SDS 发生沉淀从而给样品的 SDS-PAGE 分析带来麻烦。除这一点之外，不论单独使用尿素或盐酸胍或二者并用，对纯化过程的其他任何环节都没有影响。

(23)可供选择的洗脱方法有多种。单体通常可用缓冲液 D 洗脱，而多聚体、聚集体和带有两个 6×His 标签的蛋白质一般可用缓冲液 E 洗脱。洗脱也可以于 pH 值在 4.0～6.5范围内变化的 8 mol/L 尿素或 0.1 mol/L NaH_2PO_4 或 0.01 mol/L Tris-HCl 中进行。如果希望在较高的 pH 值中洗脱，则对大多数蛋白质来说可用含有

100～250 mmol/L咪唑的缓冲液 B。

(24)如果表达水平过高，采用下述方法中的一种或多种可以解决问题：减少 IPTG 用量（0.01 mmol/L）能使表达水平降低 10～15 倍；缩短诱导培养时间和/或降低培养温度；在较高的细胞浓度（0.8 A_{600}）下施加诱导；开始时用非变性方法，然后采用变性方法纯化剩留在未被溶解的细胞碎片和包涵体中的蛋白质。

(25)当纯化过程中出现沉淀现象时，检查是否因带标签的蛋白质形成聚集体所引起，并尝试加入 Tween 或 Triton（可高至 2%）或 10～20 mmol/L β-巯基乙醇，并检查是否须要加入稳定辅助因子（例如 Mg^{2+}）。确保盐浓度至少达到 300 mmol/L NaCl。采用变性方法进行纯化时应检查室温（>20℃）。

(26)如果 6×His 标签与 Ni-NTA 树脂的结合不够充分，则应检查体系中是否存在螯合剂（EDTA/EGTA）、高浓度的供电子基团（NH_4）、离子型去污剂以及其他成分如甘氨酸、组胺或锌等，并用新的缓冲液重复结合步骤。如果要从培养基中提纯蛋白质，可能必须先经透析除去上述物质，然后再进行结合。若 6×His 标签隐藏在蛋白质天然结构的内部，可向用于非变性条件下样品制备的缓冲液中加入低浓度的尿素或去污剂以增加其暴露程度。缓慢的结合动力学可通过延长样品与 NTA 接触的时间以取得补偿，这在批量纯化条件下更容易做到。此外，可以尝试将6×His标签放到蛋白质的另一末端，或采用彻底的变性条件（缓冲液 A 加10 mmol/L β-巯基乙醇）。避免任何能螯合 Ni^{2+} 离子的试剂。

(27)根据带 6×His 标签的蛋白质的表达水平调节 Ni-NTA 琼脂糖的用量可以减少背景结合。尽量使树脂的结合容量不超过带标签的蛋白质量的 2～5 倍。

(28)部分地被隐藏在天然蛋白质结构内的 6×His 标签会导致蛋白质过早地被洗脱。

(29)不要用 SDS-PAGE 测定重组产物的分子质量。添加或变换几个氨基酸会使蛋白质条带位置发生移动而使测得的分子质量可能比实际分子质量高出几千道尔顿。所以不能用这种方法测定带 6×His 标签的蛋白质的分子质量。

参 考 文 献

1. Stüber, D., Matile, H., and Garotta, G. (1990) System for high-level production in *Escherichia coli* and rapid purification of recombinant proteins: application to epitope mapping, preparation of antibodies, and structure-function analysis, in *Immunological Methods,* vol. IV (Lefkovits, I. and Pernis, B., eds.), Academic, New York, pp. 121–152.
2. Janknecht, R., de Martynoff, G., Lou, J., Hipskind, R. A., Nordheim, A., and Stunnenberg, H. G. (1991) Rapid and efficient purification of native histidine-tagged protein expressed by recombinant vaccinia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88,** 8972–8976.
3. Dobeli, H.,Trecziak, A., Gillessen, D., Matile, H., Srivastava, I. K., Perrin, L. H., Jakob, P. E., and Certa, U. (1990) Expression, purification, biochemical characterization and inhibition of recombinant Plasmodium falciparum aldolase. *Mol. Biochem. Parasitol.* **41,** 259–268.

4. Lindner, P., Guth, B., Wülfing, C., Krebber, C., Steipe, B., Müller, F., and Plückthun, A. (1992) Purification of native proteins form the cytoplasm and periplasm of *Escherichia coli* using IMAC and histidine tails: a comparison of proteins and protocols. *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* **4(2),** 41–55.
5. Gu, J., et. al. (1994) Recombinant proteins attached to a Ni-NTA column: use in affinity purification of antibodies. *BioTechniques* **17(2),** 257–262.
6. Gamer, J., Bujard, H., and Bukau, B. (1992) Physical interaction between heat-shock proteins DnaK, DnaJ, and GpE and the bacterial heat-shock transcription factor σ^{32}. *Cell* **69,** 833–842.
7. Sporeno, E., Paonessa, G., Salvati, A. L., Graziani, R., Delmastro, P., Ciliberto, G., and Toniatti, C. (1994) Oncostatin *M* binds directly to gp130 and behaves as interleukin-6 antagonist on a cell line expressing gp130 but lacking functional oncostatin *M* receptors. *J. Biol Chem.* **269(15),** 10,991–10,995.
8. Polayes, D., Goldstein, A., Ward, G., and Hughes, A. (1994) TEV protease, recombinant: a site-specific protease for cleavage of affinity tags from expressed proteins. *Focus (Life Technologies, Inc.)* **16(1),** 2–5.
9. Porath, J., Carlsson, J., Olsson, I., and Belfrage, G. (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* **258,** 598,599.
10. Sulkowski, E. (1985) Purification of proteins by IMAC. *Trends Biotechnol.* **3,** 1–7.
11. Hochuli, E., Dobeli, H., and Schacher, A. (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighboring histidine residues. *J. Chromatog.* **411,** 177–184.
12. Takacs, B. J. (1979) in *Immunological Methods,* vol. 1 (Lefkovits, I. and Pernis, B., eds.), Academic, New York, p. 81.
13. Thanos, D. and Maniatis, T. (1992) The high mobility group protein HMG I(Y) is required for NF-κB-dependent virus induction of the human IFN-β gene. *Cell* **71,** 623–635.
14. Fischer, B., Perry, B., Summer, I., and Goodenough, P. (1992) A novel sequential procedure to enhance the renaturation of recombinant protein from *Escherichia coli* inclusion bodies. *Prot. Eng.* **5(6),** 593–596.
15. Urban, S. and Hildt, E. (1994) Use of Ni-NTA resin for isolation of cellular proteins binding to HBV transactivator proteins HBx and MHB[st]. *QIAGEN News* **1,** 14–16.
16. Sinha, D., et. al. (1994) Ligand binding assays with recombinant proteins refolded on an affinity matrix. *BioTechniques* **17(3),** 509–514.

收到期 2004. 5. 18
来 源 人天
书 价 47.00元
单据号
开票日期

中科院植物所图书馆
S0003528

000027850

58.17425057
406

2002
DNA及RNA基本实验技术

借者单位	借者姓名	借出日期	还书日期
	李凤霞	04.05.28	
		04.06.30	
		9.2.	

58.17425057
406

000027850

(Q-1047.0102)

ISBN 7-03-009186-8
9 787030 091864 >

生命科学编辑部
联系电话：010-64012501
http://www.lifescience.com.cn
e-mail:info@lifescience.com.cn

ISBN 7-03-009186-8
定 价：47.00 元